

Untersuchung fluoreszenzdetektierbarer Wirt-Gast-Wechselwirkungen und deren Einsatz für sensitive Sonden in Mikroarrays

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

vorgelegt von

Karina Schönefeld
aus Lutherstadt Wittenberg

genehmigt von der
Fakultät für Natur- und Materialwissenschaften
der Technischen Universität Clausthal

Tag der mündlichen Prüfung:
24.07.2006

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2003 bis Juni 2006 im Fachbereich Medizintechnik an der Fachhochschule Jena im Bereich Instrumentelle Analytik/ am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Technischen Universität Clausthal angefertigt.

Dekan:	Prof. Dr. W. Schade
Hauptberichterstatter:	Prof. Dr. G. Schwedt
Berichterstatter:	PD Dr. J. Adams
Berichterstatter:	Prof. Dr. K.-H. Feller (FH Jena)

Danksagung

Ich möchte mich in erster Linie ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. K.-H. Feller von der Fachhochschule Jena für die Schaffung exzellenter Arbeitsbedingungen und seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht hat. Seine hervorragende Betreuung und Unterstützung war mir stets eine große Hilfe.

Herrn Prof. Dr. G. Schwedt von der Technischen Universität Clausthal danke ich für die Betreuung und die stetige Unterstützung und für die Möglichkeit, die Arbeit in dieser Form zu realisieren.

Herrn PD Dr. J. Adams von der Technischen Universität Clausthal gilt mein Dank für die Möglichkeit der Durchführung der zeitkorrelierten Einzelphotonenmessung, den guten Kontakt und die Übernahme des Koreferates.

Dr. T. Henkel und P. Hoffmann vom IPHT Jena danke ich für die Bereitstellung der Hydrogelfilme, die Diskussionen und Anregungen dazu.

Für die Bereitstellung und Synthese der Wirtverbindungen danke ich D. Kunze, T. Gruber, Prof. Dr. E. Weber und weiteren Mitarbeitern von der Technischen Universität Bergakademie Freiberg.

Dr. E. Gaizaukas von der Universität Vilnius danke ich für die Unterstützung bei den spektroskopischen Berechnungen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. R. Ludwig von der Freien Universität Berlin für die Synthese von C6DA und deC6DA sowie die hilfreiche Unterstützung.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. M. Friedrich für die Durchführung der NMR-spektroskopischen Untersuchungen an der Friedrich Schiller Universität Jena.

Herrn Dr. Rhien von der Universität Frankfurt danke ich für die Aufnahme der transienten Absorptionsspektren.

Bei meinen vielen Kollegen der Arbeitsgruppe, möchte ich mich natürlich ganz besonders bedanken. Die gemeinsamen Diskussionen und Experimente sowie das Arbeitsumfeld unterstützten mich bei dieser Arbeit sehr. Stellvertretend seien hier Frau Dr. Ch. Bartzsch, J. Trompelt, M. Schimmelpfennig, M. Bannert, A. Barann, K. Vogel und K. Lachnitt genannt.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meiner Familie für das Verständnis, die Unterstützung und das Vertrauen in dieser nicht immer ganz einfachen Zeit.

Hervorgegangene Publikationen

K. Schönefeld, A. Barann, K. Vogel, K.-H. Feller, D. Kunze, P. Müller, E. Weber, Fluorescence studies of crown ether complexes - solvent effects regarding the inclusion properties of host-guest sensor complexes, Intern. J. Environ. Anal. Chem. Vol. 85, Nos. 9-11, 655-663 (2005)

K. Schönefeld, R. Ludwig, K.-H. Feller, Fluorescence studies of host-guest interaction of a dansyl amide labelled calix[6]arene, J. Fluorescence, Vol. 16, No. 3, 449-454 (2006)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Motivation	2
1.2	Gegenstand der Arbeit	3
2	Grundlagen	5
2.1	Chemischer Sensor	6
2.1.1	Definition	7
2.1.2	Anwendungen chemischer Sensoren - Sensor-Arrays	12
2.1.3	Auswahl des Detektionsprinzips	13
2.2	Charakterisierung von Wirtverbindungen	15
2.2.1	Fluoreszenzquantenausbeute	16
2.2.2	Relative Fluoreszenzintensität	16
2.2.3	Wellenlängenverschiebung	17
2.2.4	Fluoreszenzlebensdauer	17
2.3	Makrozyklische Wirtverbindungen	18
2.3.1	Kronenether	19
2.3.2	Calixarene	21
2.3.3	Wirt-Gast-Wechselwirkung	23
2.4	Modellanalytsubstanzen	24
2.4.1	Terpene	24
2.4.2	Alkaloide	24
2.4.3	Aminosäuren	25
2.4.4	Amine	26
2.5	Immobilisierung in Sensoroberflächen	26
2.5.1	PEG-basierte Hydrogelfilme	26
2.6	Desorption aus Filmen	28
2.6.1	Allgemeines	28
2.6.2	Thermodesorption	29
2.6.3	Modellmäßige Beschreibung der thermischen Desorption für Wirt-Gast-Systeme	30
2.7	HS-SPME GC/MS	31
3	Experimentelle Bedingungen	33
3.1	Instrumentelle Parameter	34
3.1.1	Statische Fluoreszenzspektroskopie	34
3.1.2	UV-Vis-Absorptionsspektroskopie	34
3.1.3	HS-SPME-GC/MS	34
3.2	Methoden	34
3.2.1	Bestimmung des Fluoreszenzverhaltens in Abhängigkeit der Umgebung	36
3.2.2	Flüssig-Flüssig-Extraktion einer wässrigen 15K5-Lösung	36
3.2.3	Screening	36

3.2.4	Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der Komplexstöchiometrie von C6DA und Atropin	38
3.2.5	Anionenaustausch	38
3.2.6	Kovalente Anbindung der Wirtverbindungen an Hydrogelfilme	39
4	Wirtverbindungen in Lösung	41
4.1	Übersicht	42
4.2	Anthracen-Kronenetherverbindung 15K5A	44
4.2.1	Grundspektren des Absorptions- und Emissionsverhalten	44
4.2.2	Einfluss diverser Umgebungsbedingungen auf das Emissionsverhalten	46
4.2.3	Wässrige Umgebungsbedingungen	49
4.2.4	NMR-spektroskopische Charakterisierung	58
4.2.5	Diskussion der Ergebnisse	58
4.3	Calix[6]arene C6DA und deC6DA	66
4.3.1	Grundspektren zur Absorption und Fluoreszenz	66
4.3.2	Einfluss diverser Umgebungsbedingungen auf das Emissionsverhalten	68
4.3.3	NMR-spektroskopische Charakterisierung	71
5	Screening von Wechselwirkungen	73
5.1	Allgemeines	74
5.2	Terpene	74
5.3	Alkaloide	77
5.4	Aminosäuren	77
5.5	Zusammenfassung	79
6	Wirt-Gast-Verhalten von C6DA und deC6DA	81
6.1	Atropin	82
6.2	Selektivität	86
6.2.1	Hyoscyamin	86
6.2.2	Scopolamin	87
6.2.3	Säurederivate der Alkaloide Scopolamin und Kokain	88
6.3	Querempfindlichkeit	90
6.4	Einfluss von Schweratomverbindungen	92
6.5	Diskussion	92
7	Immobilisierung in Hydrogelfilme	97
7.1	Eigenschaften von PEG-Polymerfilmen	98
7.1.1	PEG-Kettenlänge	98
7.1.2	Stabilität	98
7.1.3	Funktionalisierungsgrad	99
7.1.4	Zusammenfassung eingesetzter Hydrogelfilme	99
7.1.5	Diffusion von Wirtverbindungen	99
7.2	kovalente Anbindung	103
7.3	Wechselwirkungen in PEGA-Filmen	105
7.3.1	Kovalent angebundenes C6DA in wässriger Umgebung - Einfluss pH-Änderung	106

7.3.2	Kovalent angebundenes C6DA - und Atropin/Scopolaminhydrochlorid-Wechselwirkung	106
8	Thermodesorption - Konzeption eines Kalibrierverfahrens	109
8.1	Allgemeines	110
8.2	Stabilität der PEGA-Schichten	110
8.3	Analytbeladene Chipoberflächen	112
8.4	Konzeption des Thermodesorbers	113
9	Zusammenfassung und Ausblick	117
	Literatur	121
	Anhang	127

Abbildungsverzeichnis

2-1	Trend der Veröffentlichungen zu "Chemischer Sensor" seit 1970 [2]	6
2-2	Jablonski-Diagramm	11
2-3	schematisches Beispiel der direkten Einlagerung und der Sandwich-Bildung bei 15-Krone-5	20
2-4	Konformere der Calix[6]arene	21
2-5	prinzipielle Struktur eines Calixarens	22
2-6	prinzipielle Struktur von PEGA-Dünnschichten	27
2-7	Immobilisierungsstrategie auf Oberflächen	27
2-8	Potentialbedingungen bei Physisorption und Chemisorption	28
2-9	Verhältnisse bei der HS-SPME	32
4-1	Absorptionsspektren in Aceton, 10 mM	45
4-2	Emissionsspektren in Aceton, 10 mM	46
4-3	Abhängigkeit des Emissionsmaximums von 15K5A bei verschiedenen Polaritäten	47
4-4	Vergleichsuntersuchung durch Extraktion mit Dichlormethan	48
4-5	Einfluss des pH-Wertes auf die Emission von 15K5A	49
4-6	Fluoreszenzspektren von 15K5A in Aceton und wässriger Lösung	49
4-7	Zeitabhängiges Verhalten von 15K5A in wässriger Umgebung, 10 mM	50
4-8	relative Fluoreszenzintensität abzüglich dem Grundsignal gegenüber der Zeit	51
4-9	Semilogarithmischer Plot der abfallenden Komplexbande bei 510 nm	52
4-10	Polaritätsabhängige Umgebungsbedingungen, 10µM,	53
4-11	zeitliches Verhalten in wässriger Umgebung	55
4-12	Vergleich der Emission von 15K5A-O nach 24 h	56
4-13	Vergleich der Emission von 2-15K5A nach 24 h	57
4-14	Energiediagramm-Schema eines 9-carboxy-substituierten Anthracens	61
4-15	Potentialbild mit Übergängen im entkoppelten und gekoppelten Zustand	61
4-16	Semilogarithmischer Plot einer SPC-Messung von 10 mM 15K5A wässrigen Lösung bei Detektion der Anthracenbande (400 nm)	62
4-17	15K5A in Aceton, 2D-Kurzzeitspektrum	63
4-18	15K5A in wässriger Lösung, 2D-Kurzzeitspektrum	63
4-19	Absorptionsspektren in Acetonitril	67
4-20	Emissionsspektren in Acetonitril	67
4-21	Polaritätsabhängigkeit (ET-Wert) gegenüber Wellenlängenmaximum	68
4-22	Polaritätsabhängigkeit von Dansylamid	69
4-23a)	Verhalten von C6DA in basischen Umgebungen	69
4-23b)	Verhalten von C6DA in sauren Umgebungen	70
5-1	Einfluss von Arginin auf die Emission von C6DA	79
6-1	Fluoreszenzverhalten C6DA und Atropin	82
6-2	Fluoreszenzverhalten von C6DA in Abhängigkeit von der Atropinkonzentration	83
6-3	Job-Plot von Verhältnissen von C6DA und Atropin	84
6-4	Fluoreszenzverhalten von C6DA mit Atropin in Chloroform	85
6-5	Fluoreszenzverhalten von C6DA mit Atropin in Wasser	86

6-6	Vergleich des Einflusses von Hyoscyamin und Atropin auf C6DA	87
6-7	Vergleich des Fluoreszenzverhaltens von Atropin und Scopolamin	88
6-8	Verhalten von C6DA-Atropin und Kokainhydrochlorid	89
6-9	C6DA im Vergleich mit Scopolaminhydrochlorid und Scopolaminhydrobromid	90
6-10	Emission von C6DA in Gegenwart verschiedener Basen	91
6-11	Interaktion zwischen C6DA und Atropin	93
7-1	Vergleich C6DA-Acetonitril in Lösung und im Hydrogelfilm	
7-2	Fluoreszenzverhalten einer C6DA-Lösung vor und nach Inkubation mit dem PEGA-Harz	101
7-3	C6DA in DMF	101
7-4	Diffusion von 2-15K5A in carboxy- und aminofunktionalisierte Hydrogelfilme	102
7-5	Diffusion von deC6DA in carboxy- und aminofunktionalisierte Hydrogelfilme	102
7-6	Anregungs- und Emissionsspektrum von deC6DA kovalent angebunden an aminofunktionalisierte Schicht	104
7-7	Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Menge immobilisierter Wirtmoleküle	105
7-8	Kovalent angebundenes C6DA unter verschiedenen sauren und basischen Bedingungen	106
8-1	Vergleich der bei verschiedenen Inkubationstemperaturen abgegebenen Substanzanzahl	111
8-2	Massenspektrum des Peaks RT=21,1 min des Chromatogramm bei 150° C Inkubationstemperatur	111
8-3	GC/MS-Chromatogramme eines reinen Terpengemisches (schwarz) und aus einer mit dem Terpengemisch inkubierten PEGA-Schicht (rot)	112
8-4	Konzept der Thermodesorptionseinheit	113
8-5	Anordnung von Heizdrähten um die Gaskapillaren	114
8-6	Sensorchiphalterung für die Thermodesorption	114
8-7	Verwendeter Heizchip für die Temperierung des Sensorchips	115

Abkürzungsverzeichnis

9-ANTC	9-Anthracencarbonsäure
a	aufbauender Spektralanteil
b	abfallender Spektralanteil
c	Konzentration
c_{iP0}	Konzentration einer Substanz i in der Probe zum Zeitpunkt $t=0$
d	Schichtdicke
Δ_{Hc}	Adsorptionseenthalpie im Fall Chemisorption
Δ_{Hp}	Adsorptionseenthalpie im Fall Physisorption
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
e	Eulersche Zahl, Basis für e-Funktion
ϵ	Extinktionskoeffizient
E_A	Aktivierungsenergie
E_D	Dissoziationsenthalpie
E_{pot}	potentielle Energie
F	Summe von Exponential funktionen aus aufbauendem und abfallendem Spektralanteil
Φ_F	Fluoreszenzquantenausbeute
FET	Feldeffekttransistor
FSU	Friedrich Schiller Universität Jena
g	Entartungsgrad
G	Linienbreitenfunktion
GC	Gaschromatograph
H-H-COSY	H-H-korrelierte NMR-Spektroskopie
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence, heteronukleare (H,C)-korrelierte NMR-Spektroskopie
HS	Headspace, Gasraum
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence, heteronukleare (H,C)-korrelierte NMR-Spektroskopie
I	austretendes Licht
i	Komponente
I	totale Intensität
I_0	einfallendes Licht
I_A	absorbierte Photonen
I_F	emittierte Photonen
IPHT	Institut für Physikalische Hochtechnologien Jena
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KClO ₄	Kaliumperchlorat
k_d	Geschwindigkeitskonstante des gesamten Desorptionsprozesses
k_F	Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz
k_{IC}	Geschwindigkeitskonstante für strahlungslose Desaktivierung
k_{ISC}	Geschwindigkeitskonstante für Übergang in den Triplett-Zustand

Abkürzungsverzeichnis

k_i	Geschwindigkeitskonstante anderer Desaktivierungsprozesse
$K_{iF HS}$	Verteilungskoeffizient einer Substanz i zwischen Faser und Headspace
$K_{iHS P}$	Verteilungskoeffizient einer Substanz i zwischen Headspace und Probe
λ	Wellenlänge
MOS	Metalloxid-Sensor
MS	Massenspektrometrie
N_d	Anzahl desorbierter Moleküle
NH_2	Amin
n_i	Stoffmenge einer Substanz i
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernmagnetresonanzspektroskopie
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy, zweidimensionale NMR-Spektroskopie
N_s	Anzahl adsorbierter Moleküle
OH	Hydroxid
PEG	Polyethylenglykol
PEGA	Polyethylenglykol-bisacrylamid
PEGE	Polyethylenglykol-bisacrylsäureester
pH	negative dekadische Logarithmus der Hydronium-Ionen
R	allgemeine Gaskonstante
RSD	relative Standardabweichung
S	Spektrum
S_0	elektronischer Grundzustand im Molekül
S_1	erster angeregter elektronischer Zustand im Molekül
S_2	zweiter angeregter elektronischer Zustand im Molekül
SPC	Single photon counting, Einzelphotonenzählung
SPME	Solid Phase Microextraction, Festphasenmikroextraktion
T	Temperatur
τ	Fluoreszenzlebensdauer
t_0	Zeitpunkt Null
TUBA	Technische Universität Bergakademie Freiberg
UV	ultraviolett
v_d	Desorptionsrate pro Sekunde
V_F	Volumen der Faserbeschichtung
V_{HS}	Volumen des Headspace
V_{is}	visible (sichtbar)
V_P	Volumen der Probe

1 Einleitung

Analytische Verfahren stellen im Forschungs-, industriellen und privaten Umfeld eine wesentliche Säule dar, um den immensen Bedarf an Informationen zur Zusammensetzung, den Eigenschaften und ablaufender Prozesse aus verschiedensten Bereichen leistungsfähig zu decken. Die vorliegende Arbeit liefert entscheidende Grundlagen für die Entwicklung von neuen, miniaturisierten analytischen Sensormethoden. Ein Einstieg in die Themenstellung gibt das folgende Kapitel.

1.1 Motivation

Der Trend zur Miniaturisierung hält weiter an. Vieles soll kleiner, schneller, besser und preiswerter werden. Galt es vor einiger Zeit noch die konventionellen Methoden der Analytik zu verbessern, zu präzisieren und damit auf der anderen Seite zum Teil noch größere und teurere Geräte zu schaffen, so strebt die heutige Entwicklung und Forschung mehr und mehr in Richtung sensorgestützter kleinerer Verfahren. Ein großer Vorteil ergibt sich dabei, dass eine mobile vor Ort Analytik ermöglicht werden kann, bei dem das Messverfahren zur Probe und nicht die Probe zum Messverfahren transportiert werden kann. Je nach Anwendung können aufwendige Verfahren des Probentransportes, der Probenaufbereitung oder -anreicherung entfallen. Auch der Zeitaufwand der Analysen würde sich in vielen Fällen enorm verkürzen können. Auf der anderen Seite ist eine Miniaturisierung nicht in allen Bereichen der Analytik vorteilhaft. Zu kleine Probenvolumina beispielsweise von viskosen Lösungsmitteln sind nicht handelbar. Auch sind viele Sensoren nicht in der Lage ständige Änderungen der natürlichen Umgebungsbedingungen zu kompensieren. Robustheit und Nachweisempfindlichkeit sind dadurch nicht mehr gegeben. Eine sorgfältige Abschätzung von Vor- und Nachteilen ist notwendig.

Ein anhaltender Trend ist auf dem Gebiet der Nachahmung natürlicher Sinnesorgane zu erkennen. Beispielsweise wurden auf der Basis chemischer Sensoren, Sensor-Arrays, wie die Elektronische Nase oder Zunge, entwickelt. Die Komplexität natürlicher Sinne ist bisher nicht erreicht. Jedoch gibt es eine Reihe von Vorteilen. Beispielsweise gibt es Verfahren bei denen der Mensch als Detektor eingesetzt wird, wie im Fall des Olfaktometers oder des Sniffing-GC. Besteht die Möglichkeit, einen Sensor einzusetzen, so würde dadurch die Subjektivität, die durch jeden einzelnen Menschen hervorgerufen wird, entfallen. Die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen könnte somit erheblich verbessert werden.

Die technische Realisierung von Elektronischen Nasen beruht weitestgehend auf unspezifischen Wechselwirkungen mit den zu analysierenden Proben und anschließender Mustererkennung. Durch rapide Entwicklungen auf dem Gebiet der supramolekularen Chemie in den letzten 3 Jahrzehnten, besteht bereits heute die Möglichkeit Sondenmoleküle mit spezifischen Eigenschaften, ähnlich der in der Natur vorhandenen, zu synthetisieren. Damit ergibt sich ein weiterer Schritt in Richtung natürlicher Sinnesorgane.

Aus dem großen Interesse an analytischen Chipsystemen ist ein Verbundprojekt entstanden, dass die Evaluierung von supramolekularen Systemen für die Substanzprofilanalytik und einer darauf aufbauenden Entwicklung eines Sensorchipsystems für die parallele spezifische molekulare Erkennung zur Aufgabenstellung hat. Die Kooperation mit Instituten, Hochschulen und Industrieunternehmen ist dabei Grundlage, um Teilgebiete, wie die Substanzsynthese und die Immobilisierungstechnologie sowie die technische Realisierung des Detektions- und Auswertesystems zielgerichtet bearbeiten zu können. Die Ausnutzung selektiver Wirt-Gastmolekül-Wechselwirkungen und deren photometrischer Detektion ermöglichen dabei die schnelle und exakte Erfassung von Signalprofilen und bieten ein breites Anwendungsspek-

trum. Eingesetzt werden können diese Chiparraydetektoren beispielsweise in der Qualitätskontrolle, Produktkontrolle sowie Produktionsteuerung in der Biotechnologie, der Lebensmitteltechnologie, sowie zur Bewältigung medizinischer und umweltrelevanter Aufgabenstellungen.

1.2 Gegenstand der Arbeit

Die vorliegende Dissertation beinhaltet die Entwicklung eines Verfahrens zum Nachweis von Substanzprofilen aus flüssigen bzw. gasförmigen Proben mit Hilfe eines Chiparrays unter Ausnutzung selektiver Wirt-Gastmolekül-Wechselwirkungen. Im Vordergrund steht dabei die Betrachtung der sensitiven Rezeptoreinheit des Chipsystems. Ausgangspunkt bilden zur Verfügung gestellte, in ihrer Komposition neuartige, fluoreszierende Wirtverbindungen mit potentiellen Bindungs- bzw. Einlagerungsmöglichkeiten für Gastmoleküle. Die Arbeit umfasst im Wesentlichen drei Schritte:

1. Charakterisierung der potentiellen Sondenmoleküle und deren Wirt-Gast-Wechselwirkung anhand von Modellanalytsubstanzen
2. Immobilisierung und Charakterisierung der Sondenmoleküle in eine Polymermatrix
3. Konzeption eines Kalibrierverfahrens

Die Arbeit bildet damit die Grundlage für die Entwicklung und Realisierung eines Sensorchipsystems für die leistungsfähige Analytik von Substanzprofilen. Erst mit Kenntnis der Wechselwirkungs-Schnittstelle zum zu analysierenden System können die in der Kette folgenden Schritte wie z.B. Detektion und Auswertung vorangetrieben und optimiert werden.

2 Grundlagen

Arbeiten zur Wechselwirkungsschnittstelle von speziellen Sensorsystemen sind Gegenstand der Arbeit. Vor diesem Hintergrund werden Sensoren und die wesentlichen Grundlagen besprochen. Hauptaugenmerk liegt dabei auf den hier eingesetzten Wirt-Gastmolekül-Wechselwirkungen. Als signalgenerierendes Verfahren wird die optische Auslese basierend auf dem Prinzip der Fluoreszenz verwendet. Ein Referenzverfahren für die Analyse von Substanzgemischen wird mit der GC / MS favorisiert. Die Erzeugung von Sensorschichten erfordert die Immobilisierung der Wirtmoleküle auf Oberflächen.

2.1 Chemischer Sensor

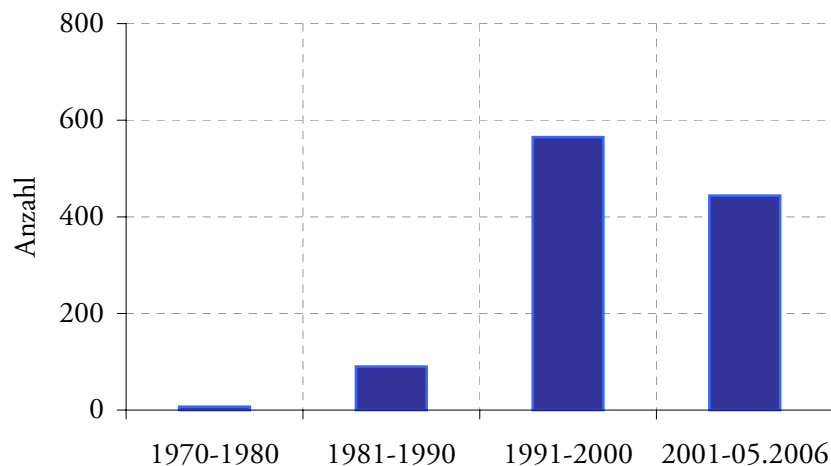
Allgemein betrachtet ist ein Sensor ein Messumwandler, der physikalische Größen in elektrische Signale umwandelt und weiterverarbeitet [1]. Eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Klassifizierung sind bekannt. Je nach Messgröße kann man beispielsweise unterscheiden zwischen:

- mechanischen Größen (z.B. Lage, Verschiebung, Kraft, Beschleunigung, Druck)
- thermischen Größen (z.B. Temperatur, Wärmefluss)
- elektrostatischen und magnetischen Größen und Flüßen
- Strahlungsintensitäten (z.B. elektromagnetisch, nuklear)
- chemischen Größen (z.B. Konzentration, Luftfeuchtigkeit, Reaktionsgeschwindigkeiten)
- biologischen Größen (z.B. Konzentration von Enzymsubstraten, Antigenen)

Entsprechend dem Wechselwirkungsmechanismus kann die Klassifizierung auch in physikalische, chemische und biologische Sensoren erfolgen.

Die Entwicklung chemischer Sensoren hat in den letzten zwei Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung erlangt. In Abb. 2-1 ist die Tendenz anhand recherchierter Publikationen in Publikationsdatenbanken seit 1970 dargestellt. Die absolute Anzahl der Publikationen kann nicht exakt ermittelt werden, die hier dargestellten Daten geben aber einen sichtbaren Trend an. Das Interesse und Potential an chemischen Sensoren wird deutlich.

Abb. 2-1
Trend der
Veröffentlichungen zu
"Chemischer Sensor"
seit 1970 [2]



Die Entwicklung chemischer Sensoren wurde zum einen durch die rapiden Fortschritte im Bereich der Mikrotechnologien und zum anderen von der fortschreitenden Nachahmung natürlicher Sinnesorgane in technische Umsetzungen geprägt. Dabei werden im Wesentlichen die Sinne "Riechen" und "Schmecken" als Ergebnis einer chemischen Analyse betrachtet. Als kommer-

zielle Geräte stehen bereits technische Sinnesorgane wie z.B. elektronische Nasen oder elektronische Zungen zur Verfügung. Weiterhin gingen Entwicklungen auf dem Gebiet der chemischen Sensoren von dem steigenden Bedarf an mobiler Analytik, d.h. chemische Analysen vor Ort durchzuführen, hervor. In einem Review von Janata et al. werden Übersichtsweise verschiedene chemische Sensoren klassifiziert nach ihrem Transducerprinzip dargestellt [3].

2.1.1 Definition

Ein chemischer Sensor ist eine Messanordnung, in welchem eine chemische Information in ein analytisch nutzbares Signal umgewandelt wird. Im Wesentlichen besteht der Sensor aus einer Rezeptor- und einer Transducereinheit [4]. Je nach Anwendungsprinzip werden unterschiedliche Anforderungen an die Sensitivität der Rezeptorschicht gestellt. Neben relativ unspezifischen Sensoroberflächen, wie Metalloxidsensoren oder Polymerschichten gewinnen in zunehmenden Maße supramolekulare Strukturen, wie Kronenether, Calixarene, Cyclodextrine, Dendrimere aber auch sich selbstorganisierende Strukturen zur Detektion von Analytsubstanzen an Bedeutung.

Beruht die sensitive Rezeptoreinheit auf einer bioaktiven Komponente oder bioaktiven Reaktion so werden diese Sensoren als Biosensoren bezeichnet. Biosensoren sind nach IUPAC betrachtet ein Spezialfall chemischer Sensoren [4, 5]. Die molekulare Erkennung beruht im Wesentlichen auf dem verallgemeinerten Prinzip der paarweisen Komplementarität und entspricht der von Fischer 1894 aufgestellten Schlüssel-Schloss-Vorstellung [6].

In chemischen Sensoren kann durch folgende Interaktionen zwischen Sensoroberfläche und Analytsubstanz Selektivität erreicht werden [7]:

- Komplexbildung
- Katalyse
- Elektrochemische Reaktion
- Chemi- oder Physisorption
- Ionenaustausch
- Membrantransport
- Bindung an immobilisierten Rezeptoren

Die Änderungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften der sensitiven Schicht unter Analyteinwirkung sind in den überwiegenden Fällen nicht direkt bestimmbar. Zur Erzeugung eines messbaren Signals wird ein Signalwandler¹ benötigt. Damit können beispielsweise Änderungen von optischen Eigenschaften, Massen oder Widerstandsänderungen erfasst und über eine Elektronik mit Hilfe spezieller Programme ausgewertet werden.

¹Transducer

Transducerarten

Die Klassifizierung chemischer Sensoren wird häufig nach ihrer Transducereinheit vorgenommen. Nach IUPAC finden die in Tabelle 2-1 dargestellten Verfahren und ihre messbaren Eigenschaften Anwendung [4].

Tabelle 2-1
Sensorverfahren und
deren Eigenschaften

Verfahren	Eigenschaften
1. Optische Verfahren	Absorption, Reflektion, Lumineszenz, Brechungsindex, Streuung, Absorption in evaneszenten Felder
2. Elektrochemische Verfahren	potentiometrisch, amperometrisch, konduktometrisch (chemisch sensitive FET)
3. Massensensitive Verfahren	piezoelektrisch, Oberflächenwellen
4. Magnetische Verfahren	Paramagnetismus
5. Thermische Verfahren	Reaktionswärme
6. Andere	Röntgen-, beta-, gamma-Strahlung

Die Änderungen der erfassbaren Messgrößen sind nicht immer proportional der Analytkonzentration. Unterschiedliche Signalverläufe können bei gleicher sensibler Schicht, je nach Transducerprinzip, in Abhängigkeit von der Konzentration des Analyten erhalten werden. Demzufolge müssen Transducer und sensitive Schicht für jedes Problem optimal aufeinander abgestimmt werden. Eine Auswahl des Detektionsprinzips in Verbindung mit der sensiblen Schicht erfolgt hauptsächlich nach Kriterien wie Sensitivität, Selektivität, Stabilität¹ sowie Ansprechverhalten, Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit. Weiterhin einbezogen werden können Genauigkeit, Auflösung, Lebensdauer und Reversibilität [5].

¹mechanische und
chemische Stabilität,
Langzeitstabilität

In Anbetracht der Tatsache, dass man nicht allen Anforderungen in gleichem Maße gerecht werden kann, müssen je nach Analysenaufgabe Aufwand und Nutzen abgewogen werden. Beispielsweise könnte in Hinblick auf die Reversibilität von Sensorsystemen auf hohe Selektivitäten verzichtet werden, da diese häufig auf starken molekularen Wechselwirkungen beruhen und somit neben einer geringeren Reversibilität daraus auch höhere Kosten resultieren. Alternativen stellen Sensor-Arrays mit mehreren weniger selektiven Einzelsensoren unterschiedlicher Eigenschaften dar. Die qualitative Untersuchung komplexer Stoffgemische wird hinsichtlich der erhaltenen Datensätze mit chemometrischen Auswertemethoden erreicht.

Im Wesentlichen finden Transducerverfahren basierend auf massensensitiven, optischen und elektrochemischen Prinzipien Anwendung in Sensor-Arrays. Die Grundlagen dazu werden im Folgenden kurz dargestellt.

Massensensitive Verfahren

Massensensitive Verfahren beruhen auf durch Massenänderungen hervorgerufenen Änderungen der physikalischen Eigenschaften. Sie sind vom Prinzip her kleinste Waagen¹ auf Basis des piezoelektrischen Effektes, wobei, hervorgerufen durch elektrische Anregung, die Änderung der Ausbreitung von akustischen Wellen in Substraten zugrunde liegt. Dabei unterscheidet man zwischen zwei Prinzipien, Prinzipien, die sich an der Oberfläche ausbreitende Wellen zunutze machen und Prinzipien, die Volumenwellen in Kristallen verwenden. Aufgrund der günstigen Materialeigenschaften des Quarzes als piezoelektrisches Material beruhen viele technische Anwendungen auf Schwingquarz-Detektoren. Auf eine Quarzscheibe werden Anschlusselektroden aufgedampft sowie eine sensitive Schicht für die Ein- bzw. Anlagerung der Analytmoleküle aufgebracht. Erstmals wurde 1959 das Prinzip der Quarz-Mikrowaage von Sauerbrey beschrieben [8]. Demnach sind die Frequenzänderungen proportional der Massenänderung.

¹Mikrowaagen

Für die sensitive Erkennungsschicht reicht das Einsatzfeld von relativ unspezifischen Polymeren [9, 10] bis hin zur gezielten Modifikation durch supramolekulare Verbindungen, womit hohe Selektivitäten erreicht werden können [11]. Beispielsweise finden mit Kronenethern oder Calixarenen beschichtete Schwingquarze zur Detektion polarer organischer Verbindungen, wie Alkohole, Amine oder organische Sulfide [9, 11-13, 14, 15] Anwendung.

Optische Verfahren

Ganz allgemein beruhen optische Verfahren auf einer Wechselwirkung zwischen Licht und Materie. Licht ist physikalisch definiert als transversale elektromagnetische Wellen. In optischen Verfahren findet der Bereich der ultravioletten bis infraroten Strahlung Anwendung. Dabei kann die von Molekülen aufgenommene Energie z.B. zur Anregung von Elektronen oder zur Rotation und Schwingung in Molekülen führen.

Für die Anwendung an optisch basierten Chemosensoren sollen vor allem die Methoden der Absorptionsmessung und der Fluoreszenzänderung beschrieben werden.

a) Absorption

Die Absorptionsspektroskopie ist eines der am häufigsten eingesetzten analytischen Verfahren. Die Abschwächung elektromagnetischer Strahlung nach dem Durchgang durch eine Probe wird als Absorption bezeichnet.

Insbesondere wird im Bereich der verfügbaren Chemosensoren in überwiegenden Maße der UV-Vis-Bereich des elektromagnetischen Wellenlängenspektrums für die Detektion angewendet. Diesbezüglich basieren eine Reihe bekannter Testverfahren, wie z.B. kolorimetrische Teststreifen zur Bestimmung des Blutzuckers in Urinproben oder Untersuchungen zur Wasserhärte auf Absorption. Für die Absorption im UV-Vis-Bereich sind Elektronenübergänge im Molekül verantwortlich. Dabei wird ein Molekül aus

seinem Grundzustand in einen angeregten Zustand überführt. Die absorbierte Energie kann dann z.B. in Form von Wärme wieder an die Umgebung abgegeben werden.

Die Absorptionsintensität wird durch das Intensitätsverhältnis zwischen einfallendem und austretendem Licht charakterisiert, wobei die Schwächung der durchtretenden Strahlung in Abhängigkeit von der Konzentration des Analyten sowie von der Schichtdicke des Mediums zu betrachten ist. Der Zusammenhang wird durch das Lambert-Beer-Gesetz (Gleichung 2-1) ausgedrückt.

Gleichung 2-1

$$\log \frac{I_0}{I} = E = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d$$

Die Gültigkeit des Gesetzes ist nur unter bestimmten Bedingungen, wie monochromatisches Licht, Vernachlässigung von Streuung und Reflexion sowie verdünnten Lösungen mit homogen verteilten Molekülen gegeben.

Absorptionsmessungen basieren auf einer immanent erforderlichen Differenzbildung zwischen der zu untersuchenden Probe und einer Referenz. Die Empfindlichkeit der Methode ist dadurch im Wesentlichen um 2-3 Größenordnungen schlechter als Lumineszenzmessungen [16, 17].

b) Fluoreszenz

Photonenemission aus elektronisch angeregten Zuständen wird allgemein als Lumineszenz bezeichnet. Die Elektronen werden vom Grundzustand S_0 durch Anregung, in den meisten Fällen durch Einstrahlung elektromagnetischer Strahlung, in den Zustand S_1 gebracht, wobei sich die Elektronen innerhalb der Zustände in verschiedenen Schwingungsniveaus aufhalten können. Alle Übergangsvorgänge der Lumineszenz sind übersichtlich in einem Jablonski-Diagramm darstellbar Abb. 2-2. Die Fluoreszenz beschreibt dabei Emissionsvorgänge, die nach einer emissionslosen Relaxation auf das geringste Schwingungsniveau von S_1 durch den Übergang von S_1 zum schwingungsangeregten Zustand von S_0 basieren. Voraussetzung für Fluoreszenz ist, dass das untersuchte Molekül in einem Bereich des elektromagnetischen Wellenlängenspektrums, im Wesentlichen im UV-Vis-Bereich, absorbiert und den angeregten Zustand strahlend verlässt. Ist ein Molekül nicht in der Lage von sich aus zu fluoreszieren so besitzt es keine so genannte Autofluoreszenz. Soll dieses Molekül dennoch fluoreszenzspektroskopisch erfasst werden, besteht z.B. die Möglichkeit fluoreszierende Marker, gebunden an das Molekül, einzusetzen. [16, 18, 19]

In Sensor-Arrays beruht die photometrische Erfassung von Signaländerungen häufig auf dem Prinzip der entkoppelten optischen Auslese, das bedeutet der räumlichen Entkopplung von molekularer Interaktion und Signalentstehung. Daneben finden optische Verfahren auch auf Basis von Lichtwellenleitern Anwendung. Dabei wird Licht in ein optisch dichtes Medium eingestrahlt und infolge der Totalreflexion so eingeschlossen, dass es über weite Entfernungen transportiert werden kann. Am bekanntesten sind die so genannten Lichtleit-

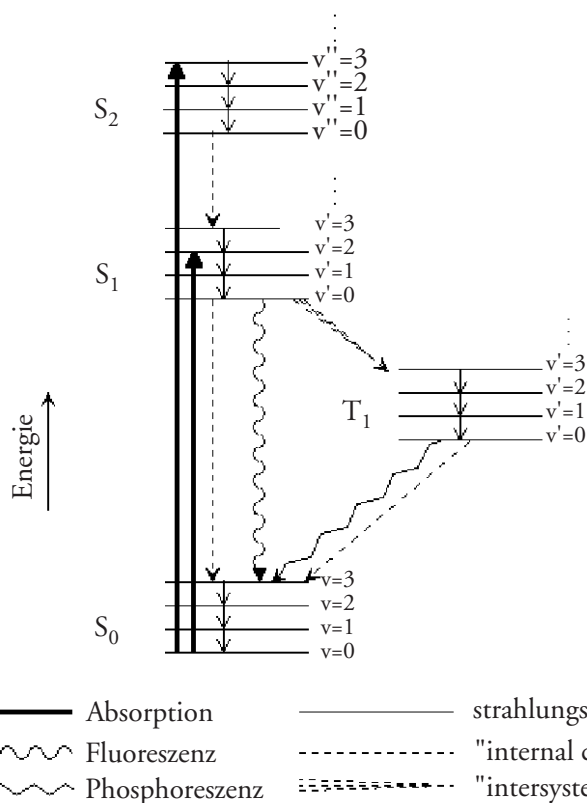


Abb. 2-2

Jablonski-Diagramm

fasern. Unter der Bezeichnung Optoden bzw. Optroden sind heute Sensoren mit einer direkt gekoppelten chemischen Erkennungsschicht auf der Basis von Lichtleitfasern bekannt. Eingesetzt werden Optoden häufig in der Detektion von Einzelsubstanzen bzw. Einzelparametern. Die Vielfalt an Anwendungsmöglichkeiten ist groß und soll hier nur an einigen Beispielen, wie z.B. die Bestimmung des pH-Wertes [20], die ionenselektive Detektion von Kalium durch Valinomycin [21], die Detektion von Sauerstoff in Wasser [22] oder die Pestizidanalytik [23] aufgezählt werden.

Elektrochemische Verfahren

Reaktionen auf Basis von Ionen, Elektroden oder Phasengrenzen zwischen Elektronen- bzw. Ionenleiter bilden die Grundlage für elektrochemische Analysenmethoden. In der Sensorik ist darauf beruhend eine Reihe von Sensoren potentiometrischer, amperometrischer oder konduktometrischer Art bekannt. In der miniaturisierten chemischen Sensorik finden zunehmend Halbleitersensoren Anwendung. Beispielsweise basieren elektronische Nasen u. a. auf Metalloxid-Sensoren. Dabei handelt es sich um ein Widerstandselement, das beispielsweise aus Zinnoxid besteht. Die zu untersuchenden Geruchsmoleküle werden an der Metalloxidoberfläche reduziert, was in einer messbaren Änderung des elektrischen Widerstandes resultiert. Durch Aufheizen des Sen-

sors werden die sorbierten Moleküle wieder entfernt. Geeignete leitfähige Polymerfilme lassen sich ebenfalls zur Detektion von Substanzklassen einsetzen. Die aus der Gasphase adsorbierten Moleküle führen zur Quellung der Polymermatrix und verändern den messbaren Widerstand.

2.1.2 Anwendungen chemischer Sensoren - Sensor-Arrays

In der Anwendung chemischer Sensoren kann man zwischen Einzelsubstanz- bzw. Einzelparameterdetektion, wie z.B. der Lambda-Sonde zur Sauerstoffmessung oder pH- Sensoren und der Mehrkomponenten- bzw. Mehrparameteranalyse in Sensor-Arrays differenzieren. Die Anwendung von Sensor-Arrays erzielt bei Anwendung gleichartiger Sensoren eine Verbesserung der Störsicherheit und somit ein stabileres Ergebnis. Zum anderen können in einem Sensor-Array mehrere Parameter parallel bestimmt werden. Dabei können Temperatur, pH- oder Lösungsmiteleinflüsse ebenso berücksichtigt werden, wie die Möglichkeit der Bestimmung vielkomponentiger Substanzgemische durch Anordnung verschiedenartiger Einzelsensoren im Array gegeben ist.

Auf Basis von Sensorarrays existieren eine Reihe von Forschungsarbeiten [20, 24-27, 127]. Kommerziell erhältliche Sensor-Arrays sind z.B. die Elektronische Nase [28] zur Detektion flüchtiger Analyten oder im Bereich der Biosensoren der DNA-Chip [29].

Elektronische Nase

Traditionell wird der biologische Geruchssinn von Mensch und Tier in der Geruchsanalytik eingesetzt. Dieser basiert auf einer Reihe von Rezeptoren in der Riechschleimhaut und anschließender neuronaler Erkennung. Ausgehend von nachteiligen Faktoren, wie Subjektivität, geringe Reproduzierbarkeit, Zeitbedarf und hoher Arbeitsaufwand wurde nach alternativen Techniken gesucht. Elektronische Nasen wurden daher im vereinfachten Sinne betrachtet mit dem Ziel der Nachahmung des biologischen Geruchssinnes eingeführt. Die technische Realisierung der elektronischen Nase entspricht einem Array aus verschiedenen Einzelsensoren, die unterschiedlich auf Substanzen ansprechen und somit ein Signalprofil ergeben [28, 30, 31]. Mit Hilfe einer anschließenden Mustererkennung, insbesondere durch Anwendung chemometrischer Methoden, wie der Hauptkomponentenanalyse oder Clusteranalyse besteht die Möglichkeit komplexe Gerüche zu erfassen und mittels Kalibrierdaten zuzuordnen.

Betrachtet man den heutigen Stand der Technik so sind die Unterschiede zwischen dem biologischen Geruchssinn und der tatsächlichen technischen Umsetzung der Elektronischen Nase noch extrem groß. Gemeinsam basieren beide auf dem vereinfachten Prinzip der Erkennung eines Gesamteindrucks einer Probe. Technisch ist eine Unterscheidung zwischen geruchslosen und geruchsaktiven flüchtigen Substanzen jedoch leider nicht möglich. Des Weiteren können auch geruchsbestimmende Substanzen geringer Konzentrationen, die ein Geruchsprofil entscheidend beeinflussen, durch die elektronischen

Nasen oftmals nicht erkannt werden. Die Gesamtheit aller detektierten flüchtigen Verbindungen wird hierbei in einem Signalprofil wiedergegeben. Mit Hilfe von Kalibrierdaten erstellte Duftstoff- oder Aroma-Bibliotheken ermöglichen dabei die Zuordnung von Signalprofilen unbekannter Proben zu einem bereits bekannten Profil.

Vorteilhaft für elektronische Nasen gegenüber dem biologischen Geruchssinn ist z.B. die bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, da diese nicht von der jeweiligen "Tagesform" abhängig sind oder mit der Zeit bestimmte Gerüche adaptieren.

Anwendung finden Elektronische Nasen vor allem in der Parfüm- und Lebensmittelindustrie in der Qualitätskontrolle von Rohstoffen und Endprodukten. Kommerziell erhältliche Geräte basieren dabei im Wesentlichen auf Metalloxid-Sensoren, auf Quarzmikrowaagen oder leitfähigen Polymeren.

Im Bereich der Nahrungsmittelindustrie reicht der Einsatz Elektronischer Nasen von der Bestimmung des Frischeszustandes z.B. von Fischen [32], über die Überwachung von Reifeprozessen von Käsesorten [33, 34] bis hin zur Unterscheidung von Whisky- [35] oder Kaffeesorten [36, 37], um nur einige Beispiele zu nennen.

DNA-Chip

In Elektronischen Nasen fand der Einsatz optischer Transducerverfahren bisher wenig Anwendung. Dagegen werden in kommerziell erhältlichen Biosensoren, wie DNA- oder Proteinchips optische Detektionsverfahren bevorzugt. Vielen biochemischen Verbindungen liegt Autofluoreszenz zu Grunde oder sie sind leicht mit Hilfe fluoreszierender Gruppen zu markieren.

In Hinblick auf einen neu zu entwickelnden Sensor-Array mit supramolekularen Wirtverbindungen soll vergleichend die Chiptechnologie auf Basis von DNA kurz vorgestellt werden. Einsatz finden DNA-Chips vor allem in der biomedizinischen Forschung zur Identifikation krankheitsverursachender Gene. DNA-Chips sind Mikroarrays bei denen in regelmäßigen Abständen in Reihen und Spalten einzelsträngige DNA-Moleküle auf diskreten Positionen angeordnet werden. Ein bekannter DNA-Chip für Genexpressionsanalysen stellt der GeneChip von Affymetrix mit 1,3 Mio. Spots mit einem Durchmesser von 11 µm dar. Hierbei erfolgt die Synthese der Oligonukleotide direkt auf dem Chip¹. Neben den hohen Kosten in der Herstellung der Masken für die Anwendung des photolithographischen Verfahrens ist die relativ hohe Fehlerquote bei der Synthese ein Nachteil. Alternativ dazu stellt die Methode des Aufbringens ex-situ hergestellter Oligonukleotide mit spezieller Plottertechnik eine preisgünstige und zugleich flexible Methode bezüglich der Anwendung dar. Spotdichten von 10000 cm⁻² können erreicht werden.

¹*in-situ-Synthese*

2.1.3 Auswahl des Detektionsprinzips

Einige wichtige Detektionsprinzipien in der Sensorik sowie Anwendungen von Sensor-Arrays wurden dargestellt. Je nach Ziel der Anwendung und Beschaffenheit der sensitiven Schicht bieten die Verfahren unterschiedliche

Vorteile. In der vorliegenden Arbeit dienen makrozyklische Verbindungen mit kovalent angebundenen Fluoreszenzmarkern als Wirtssysteme für Analytsubstanzen. Die zu untersuchenden Wirtverbindungen stellen einen Entwicklungsschritt für einen aufzubauenden Sensor-Array dar. Durch die Erzeugung verschiedener sensitiver Spots auf einem Sensor-Array sollen komplexe Gemische unterschieden und deren charakteristisches Profil bestimmt werden können. Das Sensorsystem soll außerdem sowohl für gasförmige als auch für flüssige Medien geeignet sein. Auf der Grundlage der zuvor beschriebenen Möglichkeiten der Detektion in bereits verfügbaren Sensor-Arrays werden Vor- und Nachteile bezüglich des angewendeten Detektionsverfahrens als auch im Vergleich zu Elektronischen Nasen sowie DNA-Chips diskutiert.

Tabelle 2-2 gibt einen Überblick über die Auswahlkriterien für die vorliegende Aufgabenstellung des Sensorchips bezüglich der Detektionsmethoden wieder.

Tabelle 2-2
Übersicht über
ausgewählte
Detektionsmethoden
für Sensorchips

	massensensitive Detektion	Halbleiter-Metall- oxidsensoren	leitfähige Polymere	Fluoreszenz
für Gase / Flüssigkeiten	geeignet	geeignet	geeignet	geeignet
Spurennach- weis	geeignet	geeignet	geeignet	sehr gut geeignet
Aufwand für Messaufbau	gering	gering	gering	hoch
Markierung	nicht notwendig	nicht notwendig	nicht notwendig	bedingt notwendig
Selektivität	gut	gering	gut	gut
Paralleli- sierung pro Spot	nicht möglich	nicht möglich	nicht möglich	möglich
messbare Parameter	Frequenz	Widerstand	Widerstand	Wellenlänge, Inten- sität, Lebensdauer

Neben den zur Verfügung gestandenen, bereits fluoreszenzmarkierten Wirtverbindungen wird die Anwendung der Fluoreszenzdetektion aus folgenden Gründen favorisiert.

Während die anderen vorgestellten Verfahren im Wesentlichen Signaländerungen anhand eines messbaren Parameters detektieren, können verschiedene Parameter zur Unterscheidung und Charakterisierung von Wirt-Gast-Wechselwirkungen mit Hilfe der Fluoreszenzmethode herangezogen werden. Wellenlänge, Intensität und Lebensdauer bieten also eine breitere Basis für die Auswertung.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit über die fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften der Wirtverbindungen unterschiedlich angelagerte Analytsub-

stanzen an einem Wirtmolekül unterscheiden zu können. Vorteilhaft sind ebenfalls die extrem geringen Nachweisgrenzen die mit Fluoreszenztechniken erreicht werden können. Auch die Einzelmoleküldetektion beruht in vielen Fällen auf Fluoreszenz. Hohe Nachweisgrenzen erfordern aber auf der anderen Seite entsprechenden messtechnischen Aufwand mit sehr hochwertigen Komponenten. Es ist jedoch anzunehmen, dass bei dem zu beobachtenden rasanten Anstieg des Einsatzes von optischen Verfahren in vielen wissenschaftlichen und industriellen Bereichen erhebliche Änderungen in der Kostenstruktur zu erwarten sind.

Einen weiteren Betrachtungspunkt stellt die Variabilität der Detektionsmethode hinsichtlich der Anordnung verschiedenster Wirtmaterialien auf der Sensoroberfläche dar. Während beispielsweise bei Anwendung von Schwingquarz-Detektoren zur gezielten Unterscheidung von Analytsubstanzen pro Quarzkristall nur eine Wirtverbindung aufgebracht werden kann, besteht die Möglichkeit durch das Prinzip der entkoppelten optischen Auslese eine Sensoroberfläche mit mehreren Wirtverbindungen ähnlich der Anwendung in DNA-Arrays zu schaffen. Weiterhin könnten bereits verfügbare Spottertechniken aus der DNA-Chiptechnologie eingesetzt werden. Diese Kompatibilität eröffnet die Möglichkeit, Methoden auf einem Chip zu kombinieren. Dadurch ergibt sich eine außergewöhnlich große Zahl an Kombinationsvarianten und damit die Grundlage, bisher nicht lösbare komplexe Sensoranwendungen aufzugreifen.

Gegenüber bisher üblichen Elektronischen Nasen hätte ein derartiges Verfahren prinzipiell den Vorteil der spezifischeren Anreicherung und damit des substanzspezifischeren Nachweises. Alle bekannten elektronischen Nasen arbeiten bisher auf der Basis unspezifischer Adsorption und nachfolgender Zuordnungsversuche über eine große Datenmatrix mit mehr oder weniger zufälligen Variationen in der Anreicherung auf den verschiedenen Chip-Sensoren.

2.2 Charakterisierung von Wirtverbindungen

Im zu entwickelnden Sensor-Analyse-System wurde die Methode der Fluoreszenzdetektion auf dem Prinzip der entkoppelten optischen Auslese als Detektionsmethode ausgewählt. In Analogie zum angestrebten Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit die Technik der statischen Fluoreszenzspektroskopie im Wesentlichen zur Charakterisierung des Fluoreszenzverhaltens von Wirtverbindungen und deren Wirt-Gast-Wechselwirkungen eingesetzt.

Prinzipiell können, basierend auf Fluoreszenz, folgende Parameter zur Charakterisierung von Substanzen herangezogen werden: Fluoreszenzquantenausbeute, Wellenlänge, Lebensdauer. Dabei wird die Lebensdauer nicht mit statischen sondern mit zeitaufgelösten Fluoreszenztechniken bestimmt.

Mit Hilfe dieser Parameter lassen sich unter bestimmten Voraussetzungen Wirt-Gast-Wechselwirkungen charakterisieren. Zwei prinzipiell unterschiedliche Herangehensweisen bei der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung von Wirt-Gast-Systemen mit der Methode der Fluoreszenz sind bekannt [18]. Zum einen handelt es sich um die Einlagerung eines fluoreszierenden Gastes in eine nichtfluoreszierende Wirtverbindung und zum anderen um fluoreszie-

rende Wirtverbindung und der Einlagerung von nichtfluoreszierenden Gästen. Letzteres wurde im Rahmen der durchgeführten Arbeit angestrebt. De Silva beschreibt in einem Review die verschiedensten Möglichkeiten einer Signalgebung im Fall einer Wirt-Gastmolekül-Wechselwirkung in fluoreszierenden Sensoren und Schaltern [38]. Er geht dabei u. a. auf Charge-Transfer-Übergänge, photoinduzierte Elektronentransfersysteme oder Monomer-Excimer-Systeme ein.

Ausgehend von kovalent gebundenen fluorophoren/chromophoren Einheiten am Wirtmolekül ist die Eigenfluoreszenz des Fluoreszenzmarkers als Referenzsignal zu betrachten. Die Empfindlichkeit wird bei einem derartigen Verfahren durch die Genauigkeit einer Referenzmessung gegeben. Die wichtigen Parameter werden im Folgenden kurz beschrieben.

2.2.1 Fluoreszenzquantenausbeute

Änderungen der Fluoreszenzquantenausbeute hinsichtlich einer Intensitätserhöhung oder -erniedrigung der Emission sind als Ergebnis einer Komplexierung von Wirtmolekül und Analyt möglich.

Die Quantenausbeute (Gleichung 2-2) ist ein Maß für die Effektivität des Fluoreszenzprozesses. Sie stellt das Verhältnis zwischen Intensität der absorbierten I_A und emittierten I_F Photonen dar und wird erheblich durch die Geschwindigkeitskonstanten der Fluoreszenz k_F und der anderen Desaktivierungsprozesse k_i bestimmt:

Gleichung 2-2

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + \sum_i k_i} = \frac{I_F}{I_A}$$

Für die experimentelle Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute einer Substanz in Lösung wird häufig die Bestimmung der relativen Quantenausbeute in Bezug zu einer Standardverbindung, z.B. Chininsulfat, durchgeführt. Durch zahlreiche apparativ- und probenbedingte Faktoren, wie Lösungsmittel [39], Temperatur [40], Anregungswellenlänge [41], pH-Wert [42], fluoreszenzlöschende Substanzen [43] u. a. kann die Fluoreszenzquantenausbeute beeinflusst werden. Diese Effekte können für die analytische Bestimmung, auch an Sensoren, nutzbar gemacht werden.

2.2.2 Relative Fluoreszenzintensität

Nicht immer ist es notwendig, die Quantenausbeute zu ermitteln. Die durch sterische oder elektronische Kopplung eines Analyten an einer Wirtverbindung hervorgerufenen Änderungen der relativen Fluoreszenzintensität können ebenfalls zur Charakterisierung von Wirt-Gast-Wechselwirkungen herangezogen werden. Dazu gehören die Löschung bzw. Intensitätsverstärkung. Eine Löschung kann beispielsweise durch Fremdmoleküle oder Moleküle der gleichen

Substanz hervorgerufen werden. Bekannte Löschermoleküle sind z.B. molekularer Sauerstoff sowie verschiedene Halogenid-Ionen, wie das Jodid-Ion. Es handelt sich dabei um Stoßkomplexe. Durch Energieübertragungsprozesse vom angeregten Molekül zum Löschermolekül wird ein strahlungsloser Übergang aus dem S_1 -Zustand des angeregten Moleküls zum Grundzustand induziert. Die Fluoreszenzlöschung von Molekülen bewirkt oft nur eine relativ geringe Änderung der Fluoreszenzintensität gegenüber einem großen Ausgangssignal, da meist nur ein kleiner Teil der Löschermoleküle angelagert wird.

Die Empfindlichkeit der Fluoreszenzmessungen beruht hier auf dem Vergleich zweier Intensitäten und nähert sich bezüglich dieser der Absorptionsmessung an. Die Empfindlichkeit kann allerdings über verschiedene Herangehensweisen verbessert werden.

Zum einen kann die Einlagerung eines Analyten in eine Wirtverbindung zu einer Versteifung des Chromophorsystems führen und dadurch die Fluoreszenz gegenüber anderen Desaktivierungsprozessen begünstigt werden. Eine weitere Methode stellen Charge-Transfer-Wechselwirkungen dar, die gegenüber einer ursprünglich gelöschten Fluoreszenz eine Verstärkung erzeugen können. Somit kann die Anlagerung von Substanzen an eine Wirtverbindung mit schwachem Fluoreszenzgrundsignal eine Intensitätsverstärkung um mehrere Größenordnungen bewirken. Optimal wäre ein Löscheffekt, wenn ein Wirt : Gast-Konzentrationsverhältnis von 1 : 1 vorliegt. Voraussetzung ist hier, dass die erzeugte Änderung in der Intensität signifikant größer ist, als die Rauschbreite des Ausgangssignals.

2.2.3 Wellenlängenverschiebung

Bei Anlagerung von Analyten an bzw. in Wirtmoleküle sind in der Regel Wellenlängenverschiebungen von 2-5 nm möglich. Aufgrund der relativ breiten Fluoreszenzbanden ist es aber kaum bzw. schwer möglich diese Verschiebungen zu erfassen.

Bewirkt die Anlagerung von Substanzen an das Wirtmolekül jedoch Charge-Transfer-Übergänge oder Konformitätsänderungen so können signifikante spektrale Veränderungen hinsichtlich Lage und Form des Emissionsspektrums erwartet werden. Wellenlängenverschiebungen von 30 bis 50 nm sind denkbar. Charge-Transfer-Übergänge sind in der Regel durch breite Banden ohne vibronische Feinstruktur und durch die extreme Abhängigkeit der Lage ihrer Intensitätsmaxima von der Polarität des verwendeten Lösungsmittels zu erkennen.

Die Detektion einer Wellenlängenverschiebung stellt den sensitivsten Nachweis von Wirt-Gast-Wechselwirkungen dar, da diese unabhängig von Intensitätsschwankungen des Referenzsignals betrachtet werden kann.

2.2.4 Fluoreszenzlebensdauer

Die Fluoreszenzlebensdauer (Gleichung 2-3) gibt einen Einblick in die Kinetik der Prozesse im angeregten Zustand. Sie ist ein Maß für die Zeit, die ein Molekül durchschnittlich im angeregten Zustand verweilt, bevor es in den Grundzustand emittiert,

Gleichung 2-3

$$\tau_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + \dots}$$

wobei die Geschwindigkeitskonstanten, die für die Fluoreszenz (k_F), die strahlungslose Deaktivierung (k_{IC}) und den Übergang in den Triplett-Zustand (k_{ISC}) sind.

Experimentell erfolgt die Anregung des Moleküls durch einen unendlich kurzen Anregungspuls in den S_1 -Zustand. Dieser Zeitpunkt wird als t_0 charakterisiert. Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Moleküls im angeregten Zustand nimmt exponentiell ab. Nach der Anregung ergibt sich somit die höchste Fluoreszenzintensität. Die Fluoreszenzlebensdauer τ ergibt sich, wenn die Emission auf den Wert $1/e$ der anfänglichen Emissionsintensität abgefallen ist [44].

Je nach Länge der Fluoreszenzlebensdauer eignen sich unterschiedliche experimentelle Verfahren für die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer. Im Nanosekundenbereich und Subnanosekundenbereich ist dies die SPC, hierbei wird der zeitliche Abstand zwischen der Detektion eines Photons und dem dieses Photon auslösenden Laserimpuls gemessen. Der Laserimpuls löst eine mit der Zeit linear aufsteigende Spannungsrampe aus, die durch die Detektion des Photons gestoppt wird. Der an dieser Stelle gemessene Spannungswert wird in eine Zeit umgerechnet und bestimmt die Abklingzeit $\Delta\tau$. Im Piko-sekundenbereich verwendet man vorrangig entweder Streak-Kamera-Verfahren oder nutzt die transiente Absorptionsspektroskopie. Diese liefert neben der Fluoreszenzlebensdauer gleichzeitig Informationen über transiente Absorptionszustände. Die transiente Absorptionsspektroskopie nutzt die Anregung einer Probe mit zwei zeitlich versetzten Laserimpulsen. Dabei ist der erste Laserimpuls, der "Pump-Impuls", ein starker Impuls, der die Probe anregt. Der zweite nachfolgende Impuls ist schwach und "testet" die Absorptionsverhältnisse bei der jeweiligen Testwellenlänge. So erhält man Informationen über alle transienten Absorptionen sowie emissiven Zustände und deren Zeitverhalten und damit u. a. auch über die Fluoreszenzlebensdauer.

Führt die Ein- oder Anlagerung eines Gastmoleküls in ein Wirtsystem zu signifikanten Änderungen der Lebensdauer eines oder mehrere Chromophore, so stellt dies eine weitere empfindliche Methode zur Charakterisierung von Wirt-Gast-Wechselwirkungen dar.

2.3 Makrozyklische Wirtverbindungen

Die in heutiger Zeit zur Verfügung stehende Variationsbreite verschiedenster Rezeptormaterialien ist immens. Die Erkenntnisse der letzten drei Jahrzehnte und fortführende Forschungen auf dem Gebiet der Wirt-Gast-Chemie unter Einbeziehung supramolekularer Strukturen führen zur Schaffung immer präziserer, klar definierter Strukturen für den Einsatz als sensoraktive Substanzen. Unter supramolekularen Verbindungen werden komplexe Einheiten definierter Zusammensetzung und Struktur verstanden, die aus der Zusam-

menlagerung von zwei oder mehreren chemischen Spezies hervorgehen und durch zwischenmolekulare Kräfte zusammengehalten werden [45, 46]. Durch spezifische Bindungsstellen im Rezeptormolekül werden über die verschiedensten nicht-kovalenten Wechselwirkungsmechanismen Wirt-Gast-Wechselwirkungen erzeugt, die in unterschiedlicher Weise in der Sensorik Anwendung finden. Neben hochspezifischen Rezeptormolekülen zur Detektion einzelner Substanzen werden zunehmend Sensor-Arrays mit unterschiedlich spezifischen Wirtverbindungen zur Analyse von Stoffgemischen konzipiert. Eine Auswahl an Übersichtsartikeln gibt den Eindruck über die Vielfältigkeit synthetischer Rezeptorstrukturen wieder [45, 47-51]. Von zunehmendem Interesse ist die photophysikalische und photochemische Anwendung supramolekularer Strukturen durch Anbinden chromophorer/fluorophorer Einheiten. Im Folgenden werden Kronenether und Calixarene als wichtige Vertreter in ihrer Struktur und Eigenschaften kurz dargestellt.

2.3.1 Kronenether

Die zufällige Entdeckung der Kronenether durch Pedersen und deren ungewöhnliche Eigenschaften zur Komplexierung von Alkali- und Erdalkalitionen eröffneten der Komplexchemie neue Wege und Möglichkeiten [47, 52]. Kronenether sind planar gebaute makrozyklische Polyether, die nach ihrer Gesamtanzahl aller Atome x im Ring und der Anzahl an Sauerstoffatomen y in der Form x -Krone- y klassifiziert werden.

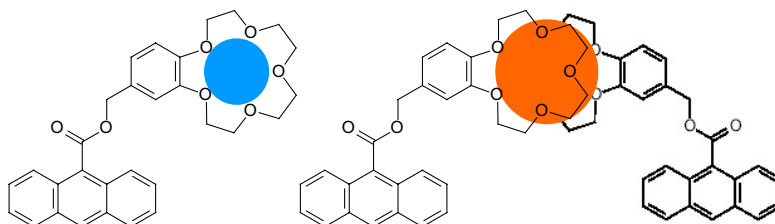
Die Fähigkeit der Kronenether zur Komplexierung wird infolge der jeweiligen Ausrichtung der Sauerstoffatome im Ring in Abhängigkeit vom umgebenen Lösungsmittel beeinflusst. In hydrophilen Medien, wie z.B. Wasser und Alkoholen, weisen die Sauerstoffatome des Kronenetherringes nach außen und ein lipophiler Kohlenwasserstoffkern ist im Inneren zu finden. In lipophiler Umgebung dagegen sind die Sauerstoffatome nach innen gerichtet und bilden somit einen hydrophilen, elektronegativen Hohlraum, so dass in diesem Fall eine Wechselwirkung mit Kationen möglich ist. Die Stärke der Wechselwirkung und die Stabilität des Komplexes hängen von der Größe des Ringdurchmessers sowie des Kations ab. In Tabelle 2-3 sind beispielhaft verschiedene Kationen-Größen und Durchmesser der Kronenether-Hohlräume dargestellt.

Kation	Kationendurchmesser, pm	Kronenether	Hohlraumdurchmesser, pm
Lithium, Li ⁺	136	12-Krone-4	120-150
Magnesium, Mg ²⁺	156		
Natrium, Na ⁺	190	15-Krone-5	170-220
Calcium, Ca ²⁺	212		
Kalium, K ⁺	266	18-Krone-6	260-320
Barium, Ba ²⁺	286		
Cäsium, Cs ⁺	338	21-Krone-7	340-430

*Tabelle 2-3
Vergleich der
Kationen- und
Hohlraumgröße der
Kronenether [53]*

So eignet sich die 15-Krone-5 vorzugsweise zur Einlagerung von Natrium-Ionen [54, 55], während Kalium-Ionen stabile Komplexe mit 18-Krone-6 [56] bildet. Die so entstandenen Wirt-Gast-Komplexe beruhen auf Ion-Dipol-Wechselwirkung. Neben der genauen Passfähigkeit von Ionen in Kronenether besteht die Möglichkeit durch so genannte Sandwichbildung von Kronenether [57], wie am Beispiel von 15-Krone-5 mit Kalium-Ionen gezeigt [58], Ionen einzuschließen. Schematisch ist dies in Abb. 2-3 dargestellt.

Abb. 2-3
schematisches
Beispiel der direkten
Einlagerung und der
Sandwich-Bildung bei
15-Krone-5



Die Komplexierungseigenschaft der Kronenether kann durch teilweise oder vollständige Substitution der Sauerstoffatome durch andere Heteroatome, wie Stickstoff, Schwefel, Phosphor oder funktionellen Gruppen, wie Amino-gruppen angepasst werden. Beispielhaft sei der Einfluss von Stickstoff- anstelle von Sauerstoffatomen in der Wechselwirkung von Ketaminhydrochlorid und Kronenetherverbindungen genannt [59]. Hier konnte nur in Anwesenheit von Stickstoffatomen eine Komplexierung beobachtet werden.

Die Einsatzmöglichkeiten der Kronenether sind vielfältig [52]. Aufgrund des gut untersuchten Komplexbildungsverhaltens mit Metall-Ionen finden sie beispielsweise Anwendung in der Ionenchromatographie [60], der selektiven Ionenextraktion [61, 62], ionenselektiven Elektroden [63, 64] sowie für Membrantransportvorgänge [65]. Auch auf dem Gebiet der Erkennung niedermolekularer Verbindungen wie z.B. der Kohlenhydraterkennung [66] finden Kronenether Anwendung.

Kronenverbindungen mit chromophoren/fluorophoren Einheiten können in optischen Sensoren eingesetzt werden. Vögtle beschrieb 1980 die Idee der optischen Detektion der selektiven Kationenkomplexierung von in Kronenverbindungen enthaltenen chromophoren/fluorophoren Einheiten durch Auslösen eines Farbeffektes [67]. Voraussetzung sei die elektronische Kopplung von Chromophor und Ligandteil. Anhand eines Dinitrophenylazophenol-Farbstoff-Kronenether konnte der Nachweis von Lithium-Ionen durch einen Farbumschlag von gelb nach rot beobachtet werden [68]. Die Detektion von Lithium- oder Kalium-Ionen konnte je nach Ringgröße der Fluorophor-Kronenverbindungen¹ auch fluoreszenzspektroskopisch nachgewiesen werden [52]. In zunehmendem Maße werden in Fluoroionophoren mit mehr oder weniger sensitiven und selektiven Eigenschaften zur Erkennung von Kationen eingesetzt [18, 52, 69]. Bouas-Laurent et al. zeigten an einem Bis(anthraceno)-Kronenether den direkten Einfluss von Kationen auf die vorhandene Monomer- und Eximerfluoreszenz der Verbindung [70]. In einem weiteren Beispiel wurde gezeigt, dass die durch einen photoinduzierten Elektronentransfer ausgelöste schwache Fluoreszenz einer Pyren-gekoppelten

¹Fluoroionophore

aza-18-Krone-6-Wirtverbindung durch die Komplexbildung mit z.B. Kalium-Ionen zu einer Verstärkung der Fluoreszenz führte [71].

Zunehmend gewinnt die Detektion von Anionen und neutralen Molekülen mit Kronenverbindungen an Bedeutung [72-75].

2.3.2 Calixarene

Calixarene sind makrozyklische Verbindungen, die durch Kondensation von Formaldehyd mit p-Alkylphenolen unter alkalischen Bedingungen erhalten werden. Den Namen "Calixarene" erhielten sie von Gutsche aufgrund ihrer kelchartigen Struktur [76]. Die Anzahl n an Phenoleinheiten im makrozyklischen Ring der Calix[n]arene bestimmt die Hohlraumgröße. Je größer, desto flexibler erscheinen sie in ihrer konformativen Beweglichkeit. Während bei Calix[4]arenen vier verschiedene Konformationen bekannt sind [76, 77], können Calix[6]arene in einer Vielzahl an Konformeren vorliegen [78-80]. Abb. 2-4 gibt eine Übersicht über mögliche Konformere der Calix[6]arene.

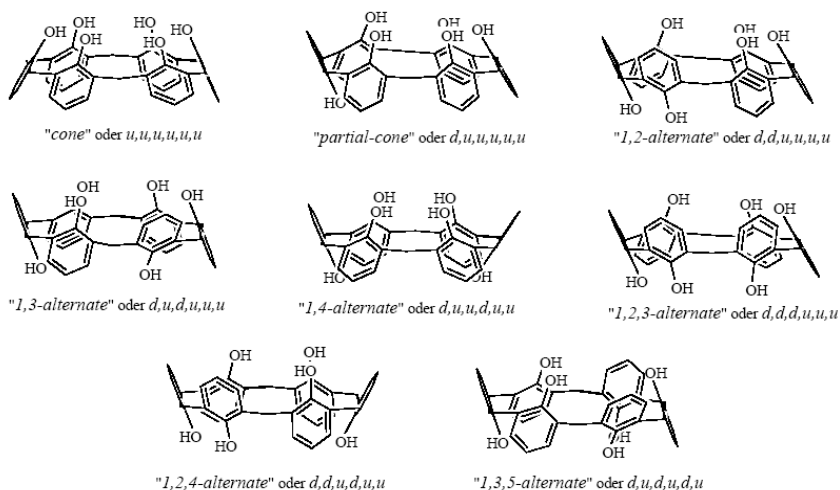


Abb. 2-4
Konformere der
Calix[6]arene

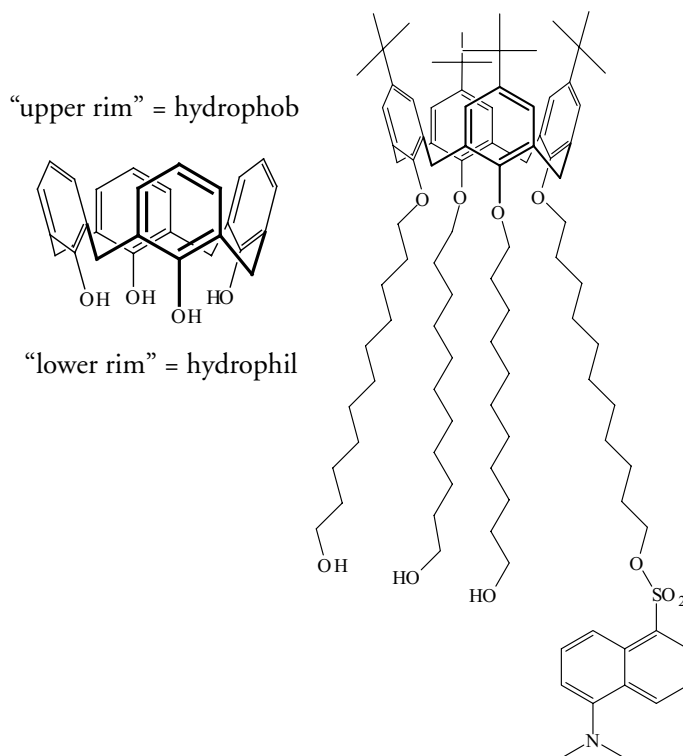
Des Weiteren zeichnen sich Calixarene durch eine hohe Stabilität aus, die auf ihre ungewöhnlich hohen Schmelzpunkte oberhalb von 250° C zurückgeführt werden kann. In modifizierten Formen, wie Calixarenester oder -ether liegen die Temperaturen für gewöhnlich tiefer [52].

Calixarene lassen sich in einen upper und lower rim¹ unterteilen (Abb. 2-5). Durch die gezielte Auswahl von Substituenten am Calixaren kann die Flexibilität der Struktur stark eingeschränkt bis eingefroren werden [81-83]. Dies kann zum einen durch die Einführung größerer Substituenten am unteren oder oberen Rand in Abhängigkeit von der Anzahl n an Phenolbausteinen im Calix[n]aren erreicht werden. Ein Beispiel dazu ist in Abb. 2-5 gezeigt. Zum anderen kann eine starre Molekülgestalt durch Verbrückung des unteren oder oberen Randes mit geeigneten Spacern erfolgen.

¹oberer und unterer
Rand

Abb. 2-5

Calixarene weisen zwei Seiten mit verschiedenen Eigenschaften auf. Die Flexibilität kann z.B. durch lange Substituenten "eingefroren" werden.



Neben der geometrischen Anordnung können des Weiteren durch Einfügen funktioneller Gruppen außerordentlich selektive Eigenschaften, bezüglich der Bindung von Ionen oder neutralen Molekülen geschaffen werden. Beispielsweise können tert-Butylgruppen in para-Stellung am upper rim einen intramolekularen Einschluss von Aromaten begünstigen, wobei diese durch Wechselwirkung des π -Systems mit den Protonen der tert-Butylgruppen gebunden werden würden [81]. Zusätzlich kann eine Erhöhung der Stabilität vieler Wirt-Gast-Verbindungen durch elektrostatische Anziehungskräfte und Wasserstoffbrückenbindungen erzielt werden [84].

Aufgrund ihrer Variationsbreite ist das Potential von Einsatzmöglichkeiten der Calixarene enorm und von zunehmender Bedeutung [52, 85-88]. Böhmer bezeichnet Calixarene als “Makrozyklen mit (fast) unbegrenzten Möglichkeiten” und gibt einen Überblick von der Synthese bis zum Nachweis von Metall-Ionen, organischen Kationen, Anionen und neutralen Molekülen [86]. Von zunehmendem Interesse ist die Anwendung von Calixarenen in optischen Sensoren. Shinkai et al. führten erste Fluoreszenzstudien zu Calixaren-Wirt-Gast-Komplexen mit Pyren und wasserlöslichen Calixarenen durch [89]. Durch die kovalente Anbindung zweier Pyreneinheiten an ein Calix[4]aren konnte ein sensibles System für Lösungsmittelpolaritäten und Metall-Ionen [90] sowie organischen Analyten [91] geschaffen werden. Auch das Gebiet des fluoreszenzspektroskopischen Nachweises von Anionen und neutralen Molekülen ist ein wesentliches Forschungsgebiet. Ein selektiver Sensor zur Erkennung von Monohydrogenphosphat wird von Gupta et al. vorgestellt [92].

Komplexe mit organischen Aminen beruhen im eigentlichen Sinne auf der elektrostatischen Wechselwirkung mit dem Calixaren-Anion [52, 93]. Luwig beschreibt in einem Review Übersichtsweise die Anwendung von Calixarenen in der analytischen Chemie [94].

Der Nachweis neutraler Analytmoleküle wurde von Bügler et al. anhand wasserlöslicher β -Cyclodextrin-Calix[4]aren-Wirtverbindungen beschrieben [95]. Hier wird die Sensitivität gegenüber ausgewählten Steroiden, Terpenen und anderen natürlichen Substanzen vorgestellt. Mate et al. zeigte die Wirt-Gast-Wechselwirkung von Calixarenen mit neutralen Benzotrifluoriden [96]. Auch in der biochemischen Erkennung und Separation finden Calixarene Anwendung [97].

Zusammenfassend reicht die Anwendungsvielfalt der Calixarene vom Ionen-transport durch hydrophobe Flüssigmembranen [98] über den Einsatz als Rezeptor in den verschiedensten Sensoren bis hin zu stationären Phasen in verschiedenen Bereichen der Chromatographie [99].

Wechselwirkung		Bindungsenthalpie [kJ/mol]	Abstandsabhängigkeit der Wechselwirkungsenergie
Kovalente Bindung		50-1000	Komplex (intermolekular und abhängig von der Wellenfunktion Ψ)
Ionen-Ionen		20-50	$1/r^2$
Wasserstoffbrücke		< 30	$1/r^4$
van-der-Waals-Kräfte	Ion-Dipol	< 20	$1/r^3$
	Dipol-Dipol	< 20	$1/r^4$
	Ion-induzierter Dipol	< 20	$1/r^5$
	Dipol-induzierter Dipol	< 20	$1/r^6$

*Tabelle 2-4
Bindungsenergien und
Reichweiten der
verschiedenen
Wechselwirkungsarten
[100]*

2.3.3 Wirt-Gast-Wechselwirkung

Die Basis der molekularen Erkennung von Wirt-Gast-Wechselwirkungen beruht im Wesentlichen auf dem von Fischer aufgestellten Schlüssel-Schloss-Prinzip [6]. Supramolekulare Strukturen bilden dabei das Schloss, welche durch ihre geeignete Bauweise, wie z.B. Größe, Form, Flexibilität oder Konformität sowie entsprechenden funktionellen Bindungsstellen in der Lage sind Gastmoleküle zu komplexieren. Dabei kann man zwischen drei Arten der Komplexierung unterscheiden:

¹Käfigkomplexe

- Anlagerungskomplexe
- Einlagerungskomplexe
- Einschlusskomplexe¹

Die Stabilität von Wirt-Gast-Komplexen basiert im Wesentlichen auf schwachen intermolekularen Wechselwirkungen. Tabelle 2-4 gibt eine Übersicht über Bindungsenergien und Reichweiten der verschiedenen Wechselwirkungsarten.

Ziel ist es diese Wechselwirkungen in Wirt-Gast-Komplexen so auszurichten, dass sowohl ein selektives als auch reversibles System resultiert.

2.4 Modellanalytsubstanzen

Zur gezielten Synthese von Wirtmolekülen existieren bis heute keine allgemeingültigen Struktur-Eigenschaftsbeziehungen. Daraus resultiert, dass sie Wirtverbindungen nicht speziell für eine bestimmte Analytsubstanzen bzw. -gruppe synthetisiert werden konnten. Insofern bestand die Notwendigkeit eines Screening mit verschiedensten Analytsubstanzen. Ausgewählt wurden Vertreter von Terpenen, Alkaloiden, Aminen bzw. Aminosäuren, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

2.4.1 Terpene

¹sekundäre
Naturstoffe

Terpene bilden eine heterogene Klasse von Naturstoffen, die im Sekundärstoffwechsel von Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren aus den C₅-Einheiten, Isopenten- bzw. Isopreneinheiten, gebildet werden. Je nach Anzahl der vorhandenen C₅-Einheiten können Hemiterpene (C₅), Monoterpene (C₁₀), Sesquiterpene (C₁₅), Diterpene (C₂₀), Sesterpene (C₂₅), Triterpene (C₃₀) und Tetraterpene (C₄₀) unterschieden werden. Über physikalische oder chemische Eigenschaften lassen sich keine allgemein gültigen Aussagen treffen. Die meisten Terpene sind schlecht wasserlöslich und werden in der Systematik der organischen Chemie zu den Lipiden¹ gezählt.

Industrielle Bedeutung kommt vor allem den Mono- und Sesquiterpenen zu, die durch ihre Flüchtigkeit bedingt den typischen Geruch von Pflanzen und Pflanzenölen ausmachen und damit als Riech- bzw. Aromastoffe Verwendung finden. Sie können als acyclische, monocyclische und bicyclische Verbindungen vorliegen. Des Weiteren besitzen viele Terpene antimikrobielle Wirkung. Als Beispiel sei das Sesquiterpen α -Bisabolol mit seinen reiz- und entzündungshemmenden Eigenschaften [101] erwähnt.

2.4.2 Alkaloide

Durch die Vielfalt existierender Alkaloide, überwiegend pflanzlicher Herkunft, ist eine einheitliche Definition nicht gegeben. Im Allgemeinen bezeichnet man Alkaloide "als stickstoffhaltige organische Verbindungen natürlichen

Ursprungs mit mehr oder weniger ausgeprägtem basischen Charakter" [102]. Ausgehend von den in Alkaloiden oftmals enthaltenen Stickstoff-Heterocyclen klassifiziert man nach Stammheterocyclen und ihren chemischen Eigenschaften.

Alkaloide werden entsprechend ihrer Wirkung pharmakologisch vielseitig eingesetzt. Sie entfalten ihre Wirkung bevorzugt auf das zentrale Nervensystem. In kleinsten Dosen verabreicht wirken Alkaloide euphorisierend bis halluzinogen auf den menschlichen Organismus [103]. Alkaloide, wie Kokain, werden aufgrund ihrer stark suchterregenden Rauschwirkung und der ausgeprägten Toxizität nicht mehr medizinisch eingesetzt. Kokain diente früher als Lokalanästhetikum.

Die zu Untersuchungen in der Arbeit herangezogenen Alkaloide gehören zur Klasse der Purin- und Tropan-Alkaloide. Purine gehören zu den Grenzfällen alkaloider Naturstoffe. Vertreter wie Koffein, Theophyllin und Theobromin sind hydroxylierte und methylierte Derivate des Purins, mit alkaloidartigem Charakter.

Neben dem Purin-Alkaloid Koffein, eines der ältesten und am besten verträglichsten Aufputschmittel wurden Tropan-Alkaloide, wozu z.B. Atropin, Scopolamin sowie Kokain gehören, in die Untersuchungen einbezogen. Bereits im Altertum wurde die pupillenerweiternde Wirkung von Atropin bevorzugt von Frauen zur Steigerung ihrer Attraktivität genutzt¹. Heute dient Atropin aufgrund der langen Abklingzeiten nicht mehr zur Pupillenerweiterung in der Augenheilkunde. Einsatz findet es beispielsweise als Antidot bei Vergiftungen mit in Pflanzenschutzmitteln eingesetzten organischen Phosphorsäureestern oder zur Prämedikation in der Anästhesiologie.

¹*Belladonna-Effekt*

2.4.3 Aminosäuren

Aminosäuren sind organische Moleküle, die mindestens eine Carboxyl- und Aminogruppe enthalten. Sie lassen sich in proteinogene und nicht-proteinogene Aminosäuren unterteilen. Im Wesentlichen wird der Begriff Aminosäuren für die biochemisch bedeutsamen proteinogenen Aminosäuren verwendet, da sie als Bausteine für die Biosynthese von Peptiden und Proteinen verantwortlich sind. Zu den "Standardaminosäuren" gehören im Wesentlichen 20 α -Aminosäuren, die nach ihren Resten in aliphatische, aromatische und polare Aminosäuren unterteilt werden. Dabei kann eine Aminogruppe in verschiedenen Gruppen gleichzeitig auftauchen. In wässriger Lösung liegen Aminosäuren als Zwitterionen vor, so dass die Aminogruppe protoniert¹ und die Carboxylgruppe² deprotoniert ist. Des Weiteren lassen sich in Abhängigkeit von ihrem Säure-Base-Verhalten die proteinogenen Aminosäuren auch in basische, z.B. Lysin oder Arginin und saure Aminosäuren, z.B. Glutaminsäure einteilen.

Die Bedeutsamkeit der Untersuchung von Aminosäuren besteht darin, dass die für den Organismus nicht selbst herstellbaren, so genannten essentiellen Aminosäuren über die Nahrung zugeführt werden müssen, um die Funktionsfähigkeit der Eiweiß-Synthese zu garantieren und gegebenenfalls lebensbedrohliche Mangelerscheinungen zu vermeiden.

¹*Protonenakzeptor*

²*Protonendonator*

2.4.4 Amine

Als Amine bezeichnet man basische, organische Abkömmlinge des Ammoniaks. Je nach Substitution der Wasserstoff-Atome gegen organische Molekülgruppen werden primäre, sekundäre und tertiäre Amine unterschieden. In Wasser reagieren Amine als Basen, wobei die Basenstärke mit steigender Alkylzahl zunimmt. Mit Säuren dagegen bilden sie Salze.

2.5 Immobilisierung in Sensoroberflächen

Allgemein betrachtet ist allen chemischen Sensoren eine mehr oder weniger sensitive Oberfläche zur Interaktion mit Analytsubstanzen gemeinsam. Außer in Metalloxid-Halbleitersensoren, wo Rezeptor- und Transducereinheit in Einem zusammentreffen bedarf es der Modifizierung der Oberflächen. Die Immobilisierung funktioneller Moleküle ist notwendig, um Sensoren mit Eigenschaften die möglichst selektiv auf Molekülgruppen oder spezifisch auf einzelne Moleküle ansprechen, zu erhalten. Bekannte Immobilisierungstechniken sind [5]:

- Adsorption
- Kovalente chemische Bindung an Oberflächen
- Einschluss in Polymerschichten, Gele oder leitfähige Pasten.

Ziel ist dabei zum einen die Wirtmoleküle in ihren Komplexbildungseigenschaften nicht zu behindern und zum anderen stabile, haltbare Sensoroberflächen zu schaffen.

2.5.1 PEG-basierte Hydrogelfilme

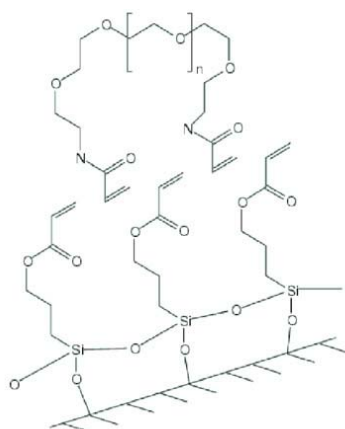
Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Immobilisierung der Wirtverbindungen Hydrogel-Trägerschichten auf der Basis von PEGE und PEGA verwendet. Diese sind hydrophil und flexibel und als "Transportpolymer" einsetzbar. Sie ermöglichen aufgrund ihrer dynamischen gelähnlichen Eigenschaft und Porosität einen schnellen Massentransfer. Beispielsweise konnte der Transfer von Enzymen mit einem Molekulargewicht von kleiner 50 kDa durch eine PEGA-Matrix der Monomergröße 1900 g/mol gezeigt werden [104, 105]. Eine große Variabilität hinsichtlich der Porengröße¹ sowie der Polyethylglykolkettenlänge ist möglich.

¹Quervernetzung

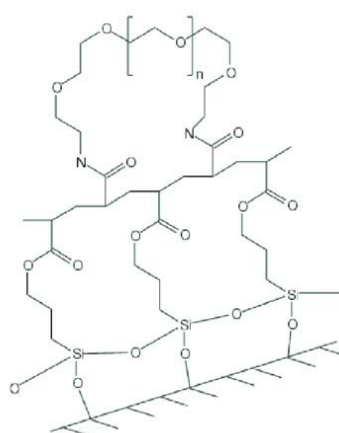
Die Herstellung der Hydrogelfilme erfolgt durch Fotopolymerisation der Ausgangsstoffe in einem Kapillarspalt über der Oberfläche des Substrates. Die Filmdicke wird dabei durch den Kapillarspalt bestimmt. In Abbildung 2-5 ist die Struktur des immobilisierten Hydrogels an einen Träger verdeutlicht.

Das Quellverhalten von PEGA-Dünnschichten ist aufgrund der Immobilisierung nicht mehr in alle Raumdimensionen möglich. Dies hat die Ausbildung von Schichtspannungen zur Folge, welche durch die kovalente Anbindung des Polymers am anorganischen Träger kompensiert werden müssen. Bei Film-

PEG-Bisacrylamid



Anorganische Träger mit Acrylgruppen



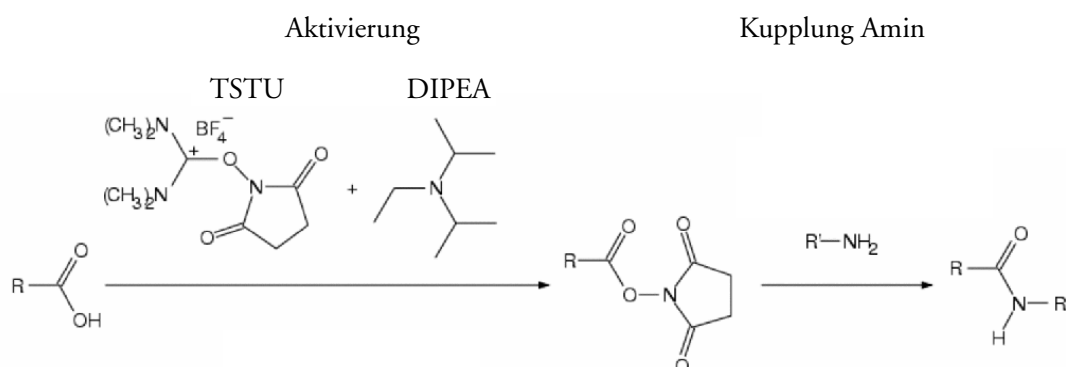
Kovalent an Träger immobilisiertes Hydrogel-Netzwerk

Abb. 2-6
Prinzipielle Struktur
von PEGA-Dünnsfilmen

dicken über 60 μm führen die Spannungen zum spontanen Ausreißen von Harzpartikeln aus der Schicht. Experimentell wurde beim Quellen eine Dickenzunahme um den Faktor 2 beobachtet [106].

Die Hydrogelfilme können durch Diffusion mit Sondenmolekülen beladen werden. In Abhängigkeit von der Größe der Sondenmoleküle sowie der Porengröße des Hydrogels werden die Moleküle festgehalten oder diffundieren wieder hinaus. Zur Schaffung einer sensoraktiven Oberfläche besteht des Weiteren die Möglichkeit zur kovalenten Anbindung der Sondenmoleküle in die Matrix des Hydrogels. Die Anwendung einer komplementären Kupplungsstrategie (Abb. 2-7) ermöglicht wahlweise die Anbindung von Wirtverbindungen über Carboxy- oder Aminogruppen über eine Amidbindung.

Abb. 2-7
Immobilisierungs-
strategie auf
Oberflächen



In Hinblick auf die Entwicklung eines Mikroarrays ermöglicht die Verwendung von Hydrogelfilmen zum einen die Diffusion und kovalente Anbindung von sensoraktiven Substanzen mit funktionellen Gruppen. Zum anderen ist

aufgrund der eingesetzten Fotopolymerisation der Hydrogelfilme unter Verwendung von Masken die Herstellung mikrostrukturierter Hydrogelfilme gegeben. Somit könnten auf einem Chiparray mehrere Wirtverbindungen separat voneinander immobilisiert werden.

2.6 Desorption aus Filmen

2.6.1 Allgemeines

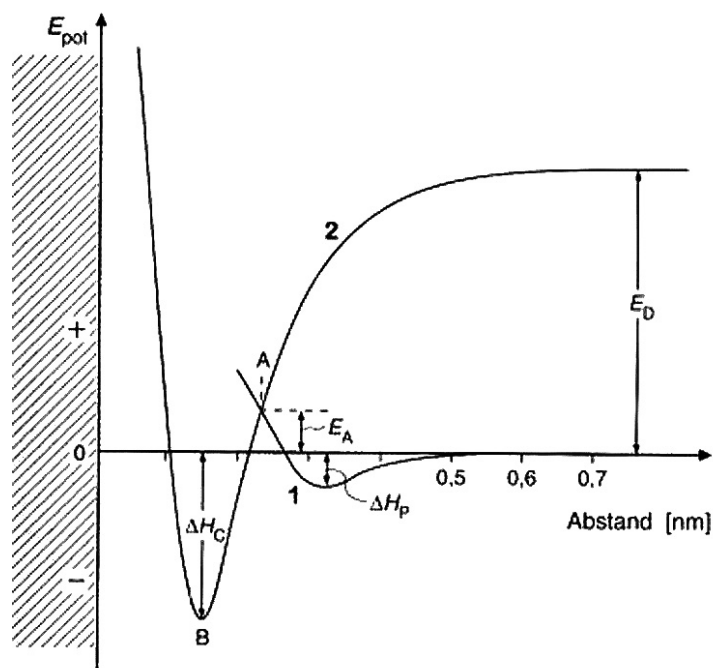
Voraussetzung für die Desorption von Substanzen ist deren vorherige Sorption in bzw. an eine feste Oberfläche. Erfolgt diese in der Hauptsache an der Oberfläche des Feststoffes, so bezeichnet man den Vorgang als Adsorption. Sie beruht auf einem Gleichgewicht aus adsorbierten und nichtadsorbierten Molekülen und wird im Wesentlichen von der Konzentration, der Temperatur und dem Druck beeinflusst.

Die für eine Adsorption verantwortlichen Wechselwirkungskräfte werden unterschieden nach:

- | | |
|----------------------------|--|
| ¹ Chemisorption | - chemische Bindungskräfte ¹ |
| ² Physisorption | - zwischenmolekulare Wechselwirkungen ² . |

Dabei gehören Dipol-Dipol-, van der Waals- oder Wasserstoffbrückenbindungen zu zwischenmolekularen Wechselwirkungen. Diese besitzen relativ schwache Bindungsenergien von 8 - 40 kJ/mol und sind daher reversibel. Hingegen stellt die Chemisorption, basierend auf chemischen Wechselwirkungen, mit Adsorptionsenthalpien von 80 bis 600 kJ/mol, eine relativ stabile und

Abb. 2-8
Potentialbedingungen
bei Physisorption und
Chemisorption
1 - Physisorption
2 - Chemisorption
(aus [107])



nur teilweise reversible bis irreversible Bindung dar. Am Beispiel eines zweiatomigen Moleküls ist in Abb. 2-8 die potentielle Energie als Funktion des Abstandes zur Adsorbensoberfläche dargestellt. Die Physisorption eines Moleküls wird demnach durch Herabsetzen der potentiellen Energie bei Unterschreiten eines bestimmten Mindestabstandes zur Oberfläche des Adsorbens ausgelöst, wobei die Adsorptionsenthalpie ΔH_p freigesetzt wird. Im Fall der Chemisorption wird eine stärkere Absenkung der potentiellen Energie herbeigeführt und die Adsorptionsenthalpie ΔH_c frei.

Voraussetzung für die Desorption ist die Zuführung von Aktivierungsenergie, um die adsorbierten Teilchen wieder aus dem Potentialminimum zu heben. Neben der Desorption ausgelöst durch Temperaturerhöhung kann die Desorption mit Wasserdampf erfolgen oder auf Druckerniedrigung beruhen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit steht die Desorption ausgelöst durch Temperaturerhöhung, speziell die Zuführung thermischer Energie im Mittelpunkt. Daneben gibt es noch weitere Desorptionsmethoden, die auf Temperaturerhöhungen basieren. Je nach Art der zugeführten Energie unterscheidet man zwischen Photodesorption, Laserdesorption, elektronisch stimulierte Desorption, Felddesorption und Mikrowellendesorption.

2.6.2 Thermodesorption

In der Analytischen Chemie stellt die Thermodesorption ein gängiges Verfahren zur Probenaufbereitung und -überführung dar. Durch Zuführung von Energie in Form von Wärme wird die Wechselwirkung zwischen den Analyten und der Adsorbensoberfläche aufgehoben. Die so freigesetzten Analytsubstanzen können anschließend z.B. in ein gaschromatographisches Trennsystem überführt und detektiert werden.

Die Adsorbermaterialien sollten so gewählt sein, dass nach erfolgter thermischer Desorption die vollständige Freisetzung der adsorbierten Probe erreicht wird. Daraus resultiert neben der Möglichkeit geringste Konzentrationen an Spurenkomponenten anzureichern und nachzuweisen eine vollständige Regeneration und Wiederverwendbarkeit der Adsorbermaterialien. Infolge der damit vorausgesetzten schwachen Wechselwirkungsenergien von Analyt und Adsorbens ist das Spektrum an verfügbaren Adsorbermaterialien begrenzt. Adsorbermaterialien auf Kohlenstoffbasis, Polymerbasis sowie anorganische Adsorbentien sind bekannt [108,109]. Beispielhaft sei das auf Polymerbasis beruhende vielseitige Tenax® erwähnt. Die Basis für Tenax® stellt das Monomer 2,6-Diphenyl-p-phenylenoxid mit einer Thermostabilität bis max. 400° C. Vorteilhaft ist dabei, dass die thermische Desorption von Komponenten ohne Zersetzung des Adsorbermaterials gewährleistet werden kann.

Im vorliegenden Fall der Wirt-Gast-Wechselwirkungen handelt es sich jedoch nicht um im herkömmlichen Sinne betrachtete Adsorptionsvorgänge mit anschließender thermischer Desorption. Die Bindungsenergien der Wirt-Gast-Wechselwirkungen werden jedoch im Bereich der Physisorption und schwacher Chemisorption erwartet. Die Methode der thermischen Desorption soll soweit dies möglich zum einen der Kalibrierung von an den Wirtverbin-

dungen angelagerten Gastmolekülen dienen. Zum anderen wird, wie auch bei herkömmlichen Adsorbermaterialien, eine Regeneration der Sensoroberfläche angestrebt.

Vorausgesetzt werden muss dabei die Freisetzung der Analytsubstanzen ohne eine Zersetzung der verwendeten PEGA-Filme sowie der darin immobilisierten Wirtverbindungen. Probleme könnten durch die relativ geringe Thermostabilität der PEGA-Filme bis etwa 150° C sowie der nicht bekannten Temperatur der Dekomposition der Wirtverbindungen auftreten.

2.6.3 Modellmäßige Beschreibung der thermischen Desorption für Wirt-Gast-Systeme

Betrachtet wird im Folgenden der Zustand eines reversiblen Systems. Es wird davon ausgegangen, dass die Wirt-Gast-Wechselwirkungsenergien im Bereich von 40 bis 80 kJ/mol liegen. Diese sind dem Bereich der Physisorption bis schwachen Chemisorption zuzuordnen.

Bei Raumtemperatur liegt prinzipiell das Adsorptions-Desorptions-Gleichgewicht zu 99,9 % auf Seiten der Adsorption. Mit Erhöhung der Temperatur ändert sich das Verhältnis signifikant zugunsten der Desorption. Mathematisch wird dieser Sachverhalt durch die Boltzmann-Verteilung der Moleküle im Gleichgewicht auf verschiedene Energiezustände beschrieben [110]. Setzt man für die Adsorptionsenthalpie die betrachteten Grenzwerte von 40 und 80 kJ/mol in die Gleichung 2-4 ein, so liefert die Gleichung

Gleichung 2-4

$$\frac{N_d}{N_s} = g \cdot e^{-\frac{\Delta E}{RT}}$$

das Verhältnis der Anzahl der desorbierten Moleküle N_d zur Anzahl der adsorbierten Moleküle N_s bei Raumtemperatur Werte von $5,4 \cdot 10^{-8}$ (40 kJ/mol) bis $3 \cdot 10^{-15}$ (80 kJ/mol).

Bei Temperaturerhöhung z. B. auf 150° C verändert sich das Verhältnis zu $2 \cdot 10^{-5}$ (40 kJ/mol) bzw. $5 \cdot 10^{-10}$ (80 kJ/mol).

In die Betrachtungen zur Desorption, z.B. in einer Durchflussküvette, muss ein Ungleichgewichtszustand aufgrund eines permanenten Abtransportes der desorbierten Moleküle durch das Trägergas einbezogen werden. Entscheidend für die Desorptionsgeschwindigkeit der angelagerten Moleküle sind dabei sowohl die Fließgeschwindigkeit im fluidischen System, als auch die Geschwindigkeitskonstante der Desorption. Nimmt man z.B. einen Fluss von 1 ml/min bei einem auszutauschenden Volumen von 20 µl an, so können die Moleküle innerhalb von 1,2 s abtransportiert werden. Es wird angenommen, dass die Trennung vom Desorptionsort durch die Fließgeschwindigkeit noch mindestens um zwei Größenordnungen schneller ist. Geht man von einer Gleichgewichtseinstellung in dieser Größenordnung aus, setzt dies eine Desorptionsgeschwindigkeitskonstante von 10^4 l/mol·s voraus, was für die vorliegenden Systeme realistisch erscheint. Größere Desorptionsgeschwin-

digkeitskonstanten würden nur dazu führen, dass das Gleichgewicht schneller eingestellt wird und der Thermodesorptionsprozeß zum Erliegen kommt. Insofern wird von einer Geschwindigkeitskonstante des Gesamt-Desorptionsprozesses k_d von ca. 10^4 l/mol·s ausgegangen [110].

Unter diesen Voraussetzungen kann man die prozentuale Desorptionsrate pro Sekunde v_d nach Gleichung 2-5

$$v_d = \left(\frac{N_d}{N_s} \right) \cdot k_d$$

Gleichung 2-5

bestimmen. Für die oben genannten Adsorptionsenthalpien liefert dieses Modell eine Desorptionsdauer von 5 s (bei 40 kJ/mol) bzw. von 11 min (bei 80 kJ/mol). Für alle noch höheren Adsorptionsenthalpien ergibt sich eine noch höhere, messtechnisch unhandhabbare Desorptionsdauer. Um bei einer anschließenden gaschromatographischen Auftrennung vernünftige Peakbreiten zu erzielen ist es bereits ab dem mittleren Bereich der Adsorptionsenthalpie notwendig, mittels Kryofokussierung die desorbierten Moleküle im GC zunächst zu sammeln. Prinzipiell kann anhand dieser Modellabschätzungen gezeigt werden, dass bei realistischen Annahmen bezüglich der Wechselwirkungsenergien und der Diffusionsgeschwindigkeitskonstanten eine reversible Führung des Nachweisprozesses über eine Thermodesorption Erfolg versprechend ist.

2.7 HS-SPME GC/MS

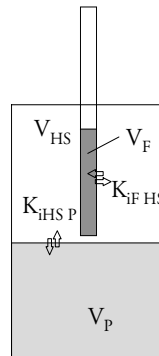
Die SPME bietet eine einfache und relativ schnelle Methode zur Anreicherung von einer Vielzahl sowohl leichtflüchtiger als auch mittel- und schwerflüchtiger Substanzen. Sie stellt im Prinzip eine Probenahme-, Extraktions-, Anreicherungs- und Probenaufgabetechnik in einer Methode dar.

Hauptsächlich wird die SPME in der Gaschromatographie eingesetzt, da hier i. A. mit Standard-Injektoren gearbeitet werden kann. Die Basis bildet eine Quarzglasfaser, die mit verschiedensten Adsorbermaterialien modifiziert werden kann. Die Adsorbermaterialien unterscheiden sich dabei hauptsächlich durch die Polarität und die Oberflächen- und Porenstruktur. Die Auswahl einer geeigneten Faser erfolgt dabei im Wesentlichen nach Flüchtigkeit und Polarität der zu untersuchenden Proben. Im vorliegenden Fall wurde ein mit Polyacrylat beschichtete Faser als geeignetes Material zur Detektion von Terpenen angewendet. Es hat sich gezeigt, dass für diese Gruppe an Stoffen Polyacrylat die beste Extraktionseffizienz aufweist [126].

Die SPME kann sowohl für die Anreicherung von Komponenten aus flüssigen Medien als auch aus der Gasphase oberhalb von Flüssigkeiten oder Feststoffen eingesetzt werden. Die Anreicherung aus dieser Gasphase bezeichnet man als HS-SPME. Nach Adsorption der Komponenten an die Faser wird diese in den Injektor des Gaschromatographen eingebracht. Durch anschließende Thermodesorption der adsorbierten Substanzen werden diese der gaschromatographischen Trennung unterzogen und über verschiedenste Möglichkeiten wie der Massenspektrometrie detektiert.

Das Verfahren der HS-SPME beruht auf der Einstellung eines Verteilungsgleichgewichtes zwischen den drei Phasen, der Probe, dem HS und der Faserbeschichtung. Die Abb. 2-9 zeigt die Bedingungen während der Analytextraktion im HS.

Abb. 2-9
Verhältnisse bei der
HS-SPME



Die Abhängigkeit der absorbierten Substanzmenge in der Faserschicht von den einzelnen Faktoren ist in folgendem Zusammenhang (Gleichung 2-6) dargestellt [112]. Dieser Zusammenhang ist nur im Gleichgewicht zwischen den -drei Phasen gültig.

Gleichung 2-6

$$n_i = \frac{c_{iP0} \cdot V_F \cdot V_P \cdot K_{iHS P} \cdot K_{iF HS}}{K_{iHS P} \cdot K_{iF HS} \cdot V_F + K_{iHS P} \cdot V_{HS} + V_P}$$

Der Vorteil der HS-SPME gegenüber der konventionellen HS-Analytik liegt in der mit geringem Aufwand erreichbaren guten Anreicherungsleistung [111]. Hinzu kommt die flexible Einsatzmöglichkeit in verschiedenartigsten Aufbauten. So kann zur Evaluierung angelagerter Moleküle auf einer Sensorschicht unter geeigneten Bedingungen, insbesondere optimierter Temperatur- und Volumenbedingungen, die SPME als Extraktionsmethode eingesetzt werden. Die extrahierten Substanzen liefern im Anschluss an die gaschromatographische Trennung ein qualitatives Profil der von der Sensorschicht aufgenommenen Komponenten. Quantitative Aussagen bedürfen einer Kalibrierung bzw. spezieller Methoden wie der HS-SPME-MHE [113].

3 Experimentelle Bedingungen

Zur Übersicht der experimentellen Gegebenheiten sind im folgenden Abschnitt die Wesentlichen Parameter der einzelnen verwendeten Methoden angegeben. Dabei werden neben instrumentellen Rahmenbedingungen auch methodisches Vorgehen besprochen.

3.1 Instrumentelle Parameter

3.1.1 Statische Fluoreszenzspektroskopie

Für die Charakterisierung des Fluoreszenzverhaltens der Wirtverbindungen und der Erfassung von Wirt-Gast-Wechselwirkungen wurde das Fluoreszenzspektrometer LS 50B von Perkin Elmer eingesetzt. Die Anregung und Emission von Substanzen wurde in einem Spektralbereich von 200 bis 800 nm untersucht. Die Spaltbreiten des Anregungs- und Emissionsmonochromators sind mit einer Schrittweite von 0,1 nm im Bereich 2,5 bis 15 nm einstellbar. Zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren in Lösung dienten 10 x 10 mm quadratische Suprasil-Quarzglas-Küvetten. Die Fluoreszenzspektren wurden in einem Winkel von 90° C aufgenommen. Zur Untersuchung der 16 x 25 mm beschichteten Chips wurde ein Feststoffhalter der Fa. Perkin Elmer eingesetzt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte ebenfalls wie in Lösung in einem Winkel von 90° C.

Zur Überwachung der Sensitivität des Spektrometers wurde das Signal-Rausch-Verhältnis über ein rechnergesteuertes Validierungsverfahren der Fa. Perkin Elmer mit destilliertem Wasser in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Einschränkungen bezüglich durchgeführter Messungen des S/N-Rauschverhältnisses sind nicht gegeben.

3.1.2 UV-Vis-Absorptionsspektroskopie

Das Absorptionsverhalten der Wirtmoleküle wurde am UV-Vis-Spektrometer Lambda 2 der Fa. Perkin Elmer untersucht. Es handelt sich um ein Zweistrahl-spektrometer mit einer Spaltbreite von 2 nm und einem Wellenlängenbereich von 190 bis 1100 nm. Die Aufnahme der Absorptionsspektren erfolgte mit Quarzglas-Küvetten¹ in einem Wellenlängenbereich von 200 bis 450 nm.

¹2 geätzte und 2
polierte Seiten

Durch die vorhandene Zweistrahl-optik konnten das Hintergrundsignal sowie das Signal der Probenlösung simultan erfasst werden. Die aufgenommenen Spektren stellen somit bereits die korrigierten Substanzspektren dar. Vor der eigentlichen Messung der Probe wurde das Gerät mit dem jeweilig verwendeten Lösemittel kalibriert.

3.1.3 HS-SPME-GC/MS

Für die Arbeiten der Bestimmung von Substanzgemischen lagen die in der Tabelle 3-1 aufgeführten Parameter zugrunde.

3.2 Methoden

¹UV-spectroscopy
grade

Alle eingesetzten Lösungsmittel wurden in spektroskopischer Reinheit¹ verwendet. Zur Aufnahme der Emissionsspektren wurde, wenn nicht anders angegeben, für die Kronenetherverbindungen eine Anregungswellenlänge von

SPME-Faser	PA, 85 µm Schicht (Supelco)
Inkubations- und Absorptionstemperaturen	abhängig vom Anwendungsfall
Vorinkubation	10 min
Inkubation	15 min
Absorption	15 min
HS-Gefäß	10 ml, Septum-gedichtet
Gaschromatograph	GC-17A (Shimadzu)
Injektor	Split/Splitless
Insert	Glasinsert ID = 0,75 mm
Injektortemperatur	260° C
SPME-Desorptionszeit	2 min
Trärgas	Helium
Trärgasfluss	1,6 ml/min bei 100 ° C
Säule	DB-5 MS, 60 m, ID = 0,25 mm, 0,25 µm Phase (J&W Scientific)
Temperaturprogramm	100° C (1 min), 160° C (3,5° C/min), 300° C (40° C/min), 300° C (5 min)
Massenspektrometer	QP 5050 (Shimadzu), an GC gekoppelt
Scanbereich	41 - 310 m/z

*Tabelle 3-1
Bedingungen für die
HS-SPME-GC/MS*

360 nm gewählt und die Calixarenverbindungen wurden mit 350 nm angeregt. Wasser wurde in deionisierter Form eingesetzt.

Die Wirtmoleküle wurden im Wesentlichen in Aceton oder Acetonitril gelöst. Ausgehend von der schweren Löslichkeit der Wirtverbindungen in Wasser wird im Rahmen dieser Arbeit unter einer wässrigen Lösung der Wirtmoleküle eine Lösung bestehend aus 90 % Wasser und 10 % Aceton oder Acetonitril verstanden. Diese wurde aus einer Stammlösung der Wirtverbindungen in Aceton bzw. Acetonitril durch Verdünnung im Verhältnis 1 : 10 in Wasser erhalten.

3.2.1 Bestimmung des Fluoreszenzverhaltens in Abhängigkeit der Umgebung

Polarität

Als experimentelle Grundlage diente eine 100 μM Stammlösung an Wirtverbindung gelöst in Acetonitril oder Aceton. Zur Überprüfung des Fluoreszenzverhaltens in Abhängigkeit von der Polarität des umgebenen Lösungsmittels wurde diese Stammlösung im Verhältnis 1 : 10 Stammlösung : Lösungsmittel in Cyclohexan, Toluol, Chloroform, Dichlormethan, Aceton, Acetonitril oder Wasser verdünnt.

Von der wässrigen Lösung der Kronenverbindungen wurden über einen Zeitraum von 24 h in unterschiedlichen Abständen Fluoreszenzspektren aufgenommen.

pH-Wert

Ausgehend von wässrigen Lösungen der Wirtverbindungen wurde das Verhalten unter extrem basischen und sauren Bedingungen untersucht. Dazu wurden zu 3 ml 10 μM Probe in Abständen jeweils 10 μl , 50 μl und 100 μl 10 mM Natronlauge oder Salzsäure hinzugegeben und fluoreszenzspektroskopisch vermessen. Der pH-Wert wurde dabei annähernd mittels Indikatorpapier bestimmt. Als Referenz wurden zu 3 ml 10 μM Probe in Abständen jeweils 10 μl , 50 μl und 100 μl Wasser hinzugegeben.

3.2.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion einer wässrigen 15K5-Lösung

Eine 24 h gelagerte wässrige Lösung der Kronenverbindung 15K5A wurde in Dichlormethan extrahiert. Beide Lösungen wurden in gleichen Mengen, jeweils 5 ml eingesetzt und 5 min in einem 250 ml Schüttelkolben geschüttelt, wobei in Abständen entgast werden musste. Anschließend wurde die Probe bei Raumtemperatur stehen gelassen bis beide Phasen voneinander getrennt vorlagen. Nach vorsichtigem Entleeren, ohne beide Phasen erneut zu vermischen, wurden diese jeweils fluoreszenzspektroskopisch vermessen.

3.2.3 Screening

Zur Untersuchung möglicher Wirt-Gast-Wechselwirkungen wurden verschiedene Vertreter niedermolekularer Analytsubstanzen, wie Terpene, Alkaloide sowie Aminosäuren eingesetzt. Getestet werden die zur Verfügung stehenden Kronenether- und Calixarenverbindungen. Im Wesentlichen, wenn nicht anders gekennzeichnet wurde eine Konzentration von 10 μM Wirtmolekül betrachtet. Die Konzentration an untersuchten Terpenen liegt bei 1 mM in Lösung. Aminosäuren wurden mit Konzentrationen um 160 μM und Alka-

loide mit Konzentrationen um 250 μM betrachtet. Die Auswertung der Daten erfolgte in Differenzbildung zum jeweiligen Grundzustand. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt unter Anwendung der Referenzmethode basierend auf den fluoreszierenden Grundeigenschaften der Wirtverbindungen. Die durch Analytsubstanzen hervorgerufenen Fluoreszenzänderungen der Wirtverbindungen wurden prozentual zum Grundsignal ermittelt.

Durchführung der Terpenuntersuchungen

Stammlösungen der Terpene von 20 mM und Wirtverbindungen von 20 μM wurden hergestellt. Die Lösungen wurden im Verhältnis 1 : 1, 1,5 ml Terpen und 1,5 ml Stammlösung, gemischt und vermessen. Die Messung der Referenzprobe erfolgte in gleicher Weise durch Verdünnung der Stammlösung 1 : 1 mit dem verwendeten Lösungsmittel. Hauptsächlich wurde für Kronenetherverbindungen Aceton und für die Calixarenverbindungen Acetonitril verwendet.

Folgende Terpene wurden für die Untersuchungen eingesetzt: Geraniol, Nerol, Limonen, Linalool, 4-Terpineol, γ -Terpinen, α -Terpineol, Citronellol, Citronellal, Eugenol, α -Bisabolol und Rosenoxid.

Durchführung Aminosäureuntersuchungen

Hergestellt wurden Stammlösungen der Aminosäuren von 10 mM in Wasser. Die Wirtverbindungen wurden mit einer Konzentration von 100 μM in Acetonitril gelöst.

Die Messungen wurden zum einen in wässriger Lösung durchgeführt. Dabei wurden die Proben wie folgt angesetzt: jeweils 2,7 ml Wasser 300 μl Wirtmolekül in Acetonitril und 50 μl Analyt.

Zum anderen wurden die Messungen in gleicher Weise in Acetonitril durchgeführt: jeweils 2,7 ml Acetonitril 300 μl Wirtmolekül in Acetonitril und 50 μl Analyt.

Die Referenz wurde dabei durch Zugabe von Wasser anstelle des Analyten vermessen.

Die Aminosäuren Arginin und Tryptophan wurden hauptsächlich in den Untersuchungen verwendet. In wässriger Lösung wurden zusätzlich Cystein, Lysin, Glutaminsäure und Citrullin eingesetzt.

Durchführung Alkaloiduntersuchungen

Hergestellt wurden Stammlösungen von 10 mM Atropin in Acetonitril und Wasser. Die Wirtverbindungen wurden mit einer Konzentration von 100 μM in Acetonitril gelöst.

Die Messungen wurden zum einen in wässriger Lösung durchgeführt. Dabei wurden die Proben wie folgt angesetzt: jeweils 2,7 ml Wasser 300 μl Wirtmolekül in Acetonitril und 50 μl Atropin in Wasser gelöst.

Zum anderen wurden die Messungen in gleicher Weise in Acetonitril durchgeführt: jeweils 2,7 ml Acetonitril 300 μ l Wirtmolekül in Acetonitril und 50 μ l Atropin in Acetonitril gelöst.

Die Referenzmessung erfolgte ohne Zugabe des Analyt.

3.2.4 Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung der Komplexstöchiometrie von C6DA und Atropin

Die Wirt-Gast-Stöchiometrie kann fluoreszenzspektroskopisch durch Darstellung in einem kontinuierlichen Variationsplot, dem so genannten Job-Plot, ermittelt werden. Dabei ist die Summe der totalen Gastkonzentration und der totalen Wirtkonzentration konstant zu halten [114, 115].

Diese Methode wurde zur Untersuchung von C6DA und Atropin angewendet. Die Experimente wurden sowohl für 10 μ M C6DA und Atropin als auch 100 μ M C6DA und Atropin in Acetonitril durchgeführt. Der Molanteil der Wirtverbindung wurde dabei von 0 nach 1 erhöht und simultan der Molanteil des Analyten Atropin von 1 nach 0 reduziert. Da es galt einen ersten Überblick zu erhalten, wurden die Abstände zwischen den einzelnen Messpunkten nicht optimal ausgewählt. Zu jedem Punkt wurde ein Emissionsspektrum aufgenommen. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 465 nm für verschiedene Konzentrationsverhältnisse von Atropin und C6DA bei konstanter Gesamtkonzentration bestimmt. Die Auswertung erfolgte abzüglich der C6DA-Grundfluoreszenz in Acetonitril und wurde gegen die Atropinkonzentration dargestellt. Aus dem Maximum des erhaltenen Graphen können Rückschlüsse auf die stöchiometrische Zusammensetzung von Wirt und Gast geschlossen werden. Ein Maximum von 0,5 würde einem Wirt : Gast-Verhältnis von 1 : 1, von 0,75 von 1 : 3 entsprechen.

3.2.5 Anionenaustausch

Im Fall von Scopolaminhydrobromid galt es mit Hilfe eines Anionenaustauschers die Bromid-Ionen zu entfernen. Dazu wurde eine mit etwa 15 cm Anionenaustauscher IRA 400-OH der Fa. Supelco selbst gepackte 20 cm lange Glassäule mit Auslaufhahn verwendet. Das Harz wurde in mit Wasser aufgeschlammter Form in die Säule gefüllt. Nach Absetzen des Harzes wurde solange mit Wasser eluiert, bis das Eluat am Ende der Säule neutral vorlag. Die Säule wurde so vorbereitet, dass das Harz nur noch mit wenig Wasser benetzt vorlag. Nun wurde die hergestellte Probenlösung zugegeben und mit einem Säulenfluss von etwa 0,33 ml/min eluiert. Am Auslauf der Säule wurde die basische Lösung des freien Alkaloids aufgefangen.

Die Probenlösung wurde aus 0,224 g Scopolaminhydrochlorid in 5 ml Wasser gelöst hergestellt.

3.2.6 Kovalente Anbindung der Wirtverbindungen an Hydrogelfilme

Die Herstellung der funktionalisierten Hydrogelfilme sowie die daran gekoppelte kovalente Anbindung der Wirtmoleküle erfolgte am IPHT Jena. Die relativ komplexe Vorgehensweise der kovalenten Anbindung wird hier nicht speziell vorgestellt.

Ausgehend von carboxylierten PEGA-Hydrogelfilmen wurden diese in DMF mit TSTU und DIPEA zu einem aktiven NHS-Ester umgesetzt. Diese könnten dann zur Anbindung von freien NH_2 -Gruppen enthaltenen Substanzen verwendet werden. Dansylamid wurde so kovalent angebunden.

Enthalten die zu koppelnden Sondenmoleküle Carboxy-Gruppen, so erfolgt nach Umsetzung zum aktiven NHS-Ester durch Inkubation mit 50 mM 1,3-Diaminopropan in DMF für 15 min die Aminofunktionalisierung der PEGA-Matrix. Anschließend werden die in DMF gelösten Wirtverbindungen auf dem aminofunktionalisierten Harz für 20 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je mindestens 3 min in DMF werden die Chips für 10 min mit 50 mM Propylamin in DMF behandelt, um überschüssige NHS-Ester zu quenchen. Zuletzt wurde noch dreimal mit DMF und zweimal mit Ethanol für je 3 min gewaschen und anschließend trocken geblasen.

4 Wirtverbindungen in Lösung

Der Einsatz fluoreszenzmarkierter Wirtmoleküle für sensoraktive Substanzen in Mikroarrays setzt die Kenntnis ihrer fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften voraus, da die Auswertung der Wechselwirkungen mit Analytsubstanzen im Wesentlichen auf der Referenzmethode basiert. Einflüsse von Umgebungsbedingungen, wie pH-Änderungen, Polaritätsänderungen sowie Temperaturschwankungen können sich erheblich auf das Fluoreszenzverhalten auswirken.

4.1 Übersicht

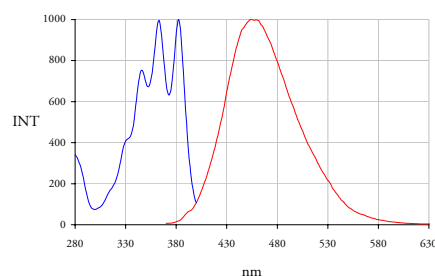
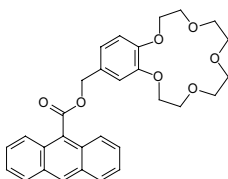
Die untersuchten Wirtmoleküle beruhen auf in ihrer Komposition neuartigen Verbindungen, die in Kooperation mit der TUBA Freiberg und der Freien Universität Berlin synthetisiert wurden. Es handelt sich dabei um makrozyklische Wirtverbindungen. Konkret waren dies zum einen Kronenetherverbindungen der Ringgröße 15-Krone-5 mit Anthraceneinheit und zum anderen Calix[n]arene mit $n = 4$ und $n = 6$, mit Dansylamid bzw. Dansylchlorid als chromophore Einheiten.

Zunächst wurde das Löseverhalten der einzelnen Wirtverbindungen in verschiedenen Umgebungen getestet. Ein möglichst universelles Lösungsmittel sollte gefunden werden, um gleiche Voraussetzungen für das Screening möglicher Wirt-Gast-Wechselwirkungen zu erhalten. Weiterhin musste das Lösungsmittel möglichst sowohl für polare als auch unpolare Analyten geeignet sein. Chloroform stellte zwar ein universelles Lösemittel für die zu untersuchenden Substanzen dar, jedoch ist es für polare Analytsubstanzen weniger geeignet. Aus den experimentellen Befunden wurden Aceton und Acetonitril als geeignete Lösemittel für die Wirtverbindungen gefunden. Neben der guten Mischbarkeit mit unpolaren und polaren Lösemitteln für polaritätsabhängige Untersuchungen konnten nahezu alle potentiellen Analytsubstanzen darin gelöst werden.

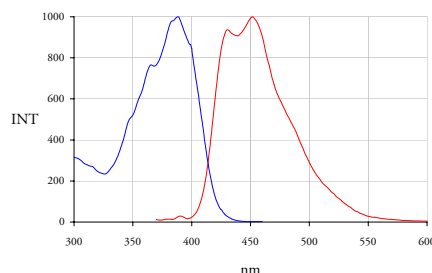
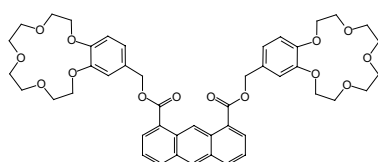
Jede Wirtverbindung wurde hinsichtlich ihrer Absorption und Fluoreszenz in Acetonitril untersucht. Die Anregung zur Emission erfolgte dabei im Maximum der Absorptions- bzw. Anregungsbande. In Tabelle 4-1 ist eine Auswahl an charakterisierten Wirtverbindungen hinsichtlich ihrer chemischen Bezeichnung, Abkürzung, Struktur sowie dem Anregungs- und Emissionsspektrum dargestellt. Weitere untersuchte Wirtverbindungen sind in ihren spektralen Grundeigenschaften im Anhang beigefügt.

Tabelle 4-1
Auswahl an
charakterisierten
Wirtverbindungen

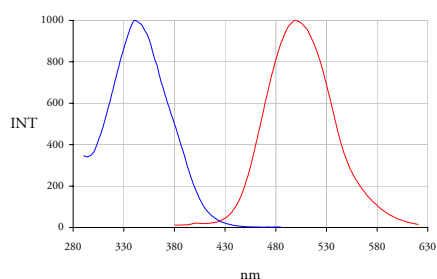
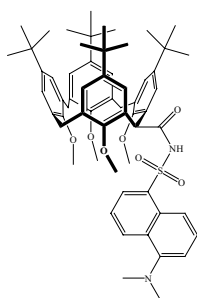
Abkürzung chemische Bezeichnung	Spektroskopische Eigenschaften
Struktur	Anregungsspektrum Emissionsspektrum
15K5A 9-[(Benzo-15-krone-5)-4'-methylenoxy-carbonyl]anthracen	$\lambda_{\text{Ex}} (\text{max}) = 363 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{Em}} (\text{max}) = 454 \text{ nm}$ Stokes shift 91 nm



Abkürzung chemische Bezeichnung	Spektroskopische Eigenschaften
Struktur	Anregungsspektrum Emissionsspektrum
2-15K5A 1,8-Bis-[(Benzo-15-krone-5)-4'-methylenoxycarbonyl] anthracen	$\lambda_{\text{Ex}} (\text{max}) = 388 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{Em}} (\text{max}) = 453 \text{ nm}$ Stokes shift 65 nm



Ziel 1 N-[5-(Dimethylamino)naphthalen-1-sulfonyl]-5,11,17,23-tetra-tert-butyl-25,26,27,28-tetramethoxy-calix[4]aren-2-carbonsäureamid	$\lambda_{\text{Ex}} (\text{max}) = 348 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{Em}} (\text{max}) = 502 \text{ nm}$ (in Chloroform) Stokes shift 154 nm
---	--



C6DA 5,11,17,23,29,35-Hexa-tert-butyl-37-(5'-dimethylaminonaphthalen-1'-sulfonylcarbamoylethoxy)-38,39,41,40,42-pentakiscarbomethoxy-calix[6]arene	$\lambda_{\text{Ex}} (\text{max}) = 350 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{Em}} (\text{max}) = 525 \text{ nm}$ Stokes shift 175 nm
--	---

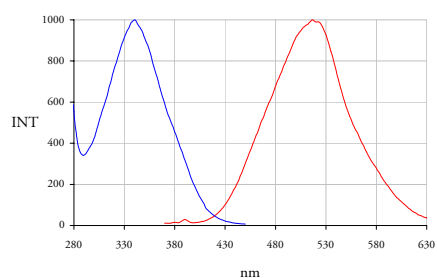
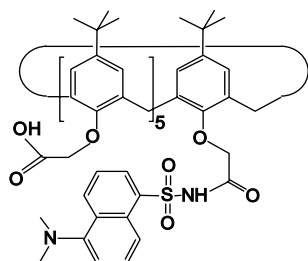
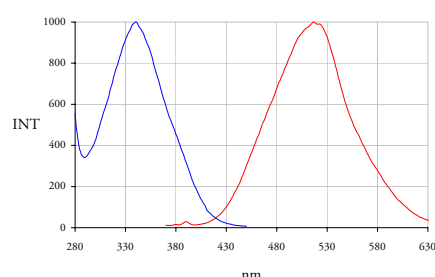
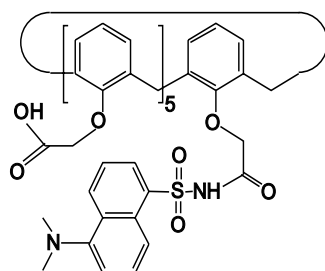


Tabelle 4-1
Auswahl an
charakterisierten
Wirtverbindungen
(Fortsetzung)

Abkürzung chemische Bezeichnung	Spektroskopische Eigenschaften
Struktur	Anregungsspektrum Emissionsspektrum
deC6DA 37-(5'-dimethylaminonaphthalene-1'-sulfonylcarbamoylmethoxy)-38,39,41,40,42-pentakis-carbomethoxy-calix[6]arene	$\lambda_{\text{Ex}} (\text{max}) = 350 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{Em}} (\text{max}) = 525 \text{ nm}$ Stokes shift 175 nm



Mit dem Ziel die Wirtmoleküle als potentielle Sondenmoleküle in Mikroarrays einsetzen zu können, müssen neben den Grundspektren mehr Untersuchungen zum Fluoreszenzverhalten, wie z.B. in Abhängigkeit von der Polarität oder vom pH-Wert der Umgebung durchgeführt werden. Die Vielzahl an Verbindungen ergab eine große Anzahl an Ergebnissen und macht die Beschränkung auf wesentliche Beispiele erforderlich. Es werden die fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften der Kronenverbindung 15K5A und der Calix[6]arene C6DA und deC6DA genauer betrachtet und diskutiert.

4.2 Anthracen-Kronenetherverbindung 15K5A

Die in ihrem fluoreszenzspektroskopischen Verhalten genauer untersuchte Wirtverbindung 9-[(Benzo-15-krone-5)-4'-methylenoxycarbonyl]anthracen [116, 117], kurz 15K5A, folgt in ihrer Struktur prinzipiell der vereinfachten Vorstellung bestehend aus einer Fluorophoreinheit, einem Linker und einer Rezeptoreinheit.

4.2.1 Grundspektren des Absorptions- und Emissionsverhalten

Das Absorptions- und Fluoreszenzverhalten von 15K5A wurde unter verschiedenen Umgebungsbedingungen betrachtet [117]. Ausgehend vom chromophoren System des Wirtmoleküls wurden Vergleichsmessungen zwischen dem gebundenen und der freien Anthraceneinheit durchgeführt. Als freie

Anthraceneinheit wurde neben Anthracen das Verhalten der 9-Anthracencarbonsäure betrachtet, da dies der eigentlichen Chromophoreinheit am 15K5A entspricht.

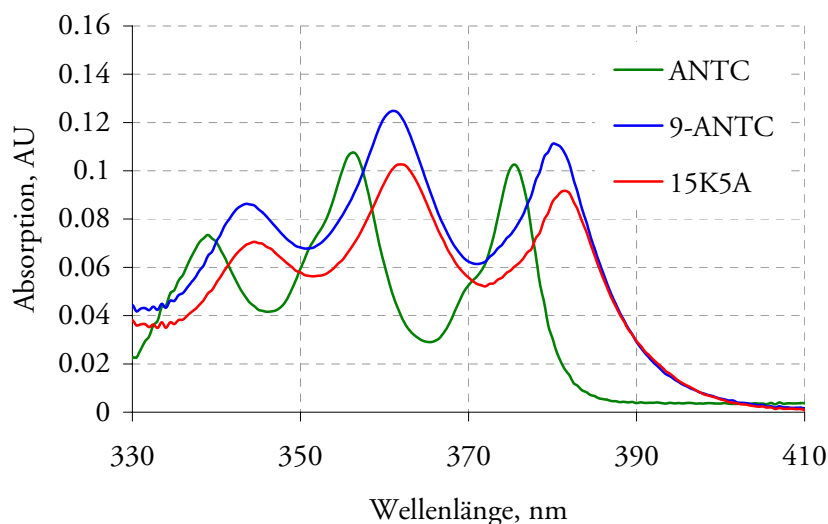
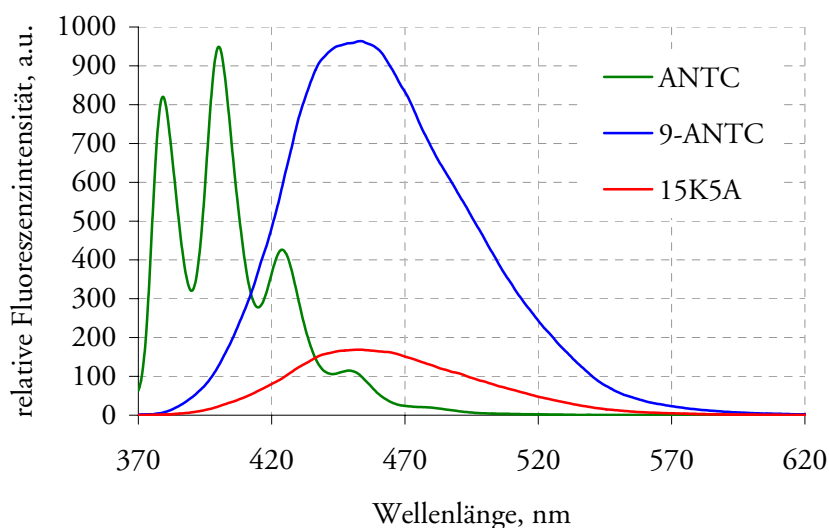


Abb. 4-1
Absorptionsspektren
in Aceton, 10 μM

Die Abb. 4-1 zeigt die Absorptionsspektren der drei Verbindungen ANTC, 9-ANTC und des Wirtmoleküls 15K5A in Aceton. Eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums um 5 nm von 15K5A und 9-ANTC im Vergleich zum Anthracen wurde beobachtet. Gegenüber Anthracen ist die Schwingungsfineinstruktur in den Absorptionsbanden der beiden anderen Verbindungen weniger stark ausgeprägt. Die "Schultern" aus den Banden des Anthracenspektrums werden nicht mehr erfasst. Konzentrationsabhängige Änderungen im Absorptionsspektrum des Wirtmoleküls 15K5A konnten nicht gefunden werden. Das Vorhanden sein von Dimeren wird ausgeschlossen, da keine darauf hinweisende Bande gefunden wurde.

Im Vergleich zu den relativ geringen Abweichungen von 15K5A zu Anthracen und 9-ANTC im Absorptionsverhalten sind wesentliche Unterschiede im Fluoreszenzverhalten zum Anthracen zu beobachten (Abb. 4-2). Während Anthracen ein Emissionsspektrum mit vibronischer Feinstruktur spiegelbildlich zur Anregung mit einem Maximum bei 400 nm zeigt, wird bei den anderen beiden Substanzen jeweils ein Emissionsspektrum mit einer strukturlosen breiten Bande und einem Maximum um 450 nm erhalten. Das Fluoreszenzverhalten von 15K5A in Aceton ist in seinen spektralen Eigenschaften hinsichtlich Bandenlage und -form der 9-ANTC identisch. Jedoch unterscheidet sich die Emission des Kronenetherkomplexes im Vergleich zur 9-ANTC durch eine 5,5-fach geringere Intensität.

Abb. 4-2
Emissionspektren in
Aceton, 10 μM
 $\lambda_{\text{EX}} = 360\text{nm}$



4.2.2 Einfluss diverser Umgebungsbedingungen auf das Emissionsverhalten

Das Emissionsverhalten von 15K5A wurde in Abhängigkeit von der Polarität des umgebenden Lösungsmittels und vom pH-Wert untersucht.

Einfluss der Polarität

Zur Charakterisierung der Polaritätsabhängigkeit von 15K5A sind Untersuchungen in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität durchgeführt worden [117]. Dabei wurden ausgehend von einer 15K5A-Stammlösung in Aceton unterschiedliche Umgebungsbedingungen geschaffen. Tendenziell konnte eine Abhängigkeit des Fluoreszenzverhaltens durch die bathochrome Verschiebung des Emissionsmaximums zwischen 440 und 480 nm mit steigender Polarität des Lösungsmittels festgestellt werden (Abb. 4-3). Die strukturlose Emissionsbande blieb dabei erhalten.

Tabelle 4-2
 E_{T} -Werte untersuchter
Lösungsmittel

Lösungsmittel	E_{T}
Cyclohexan	30.9
Toluol	33.9
Chloroform	39.1
Dichlor-methan	40.7
Aceton	42.2
Ethanol	51.9
Wasser	63.1

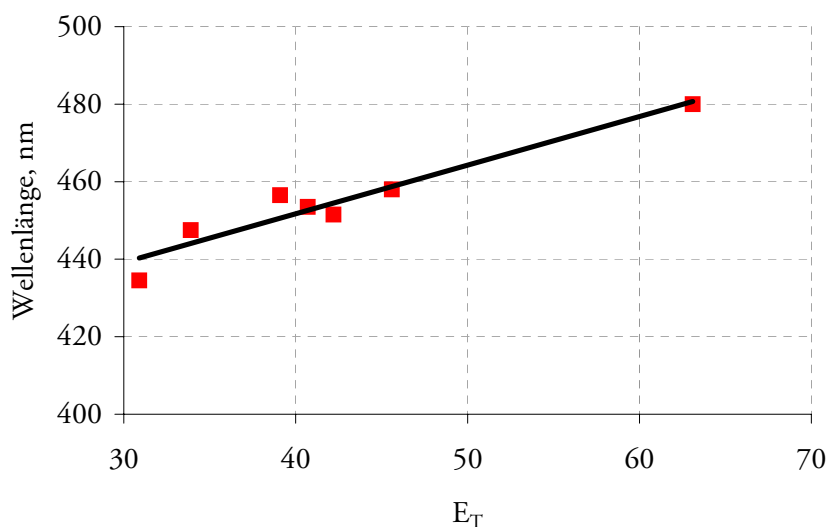


Abb. 4-3
Abhängigkeit des
Emissionsmaximums
von 15K5A bei
verschiedenen
Polaritäten

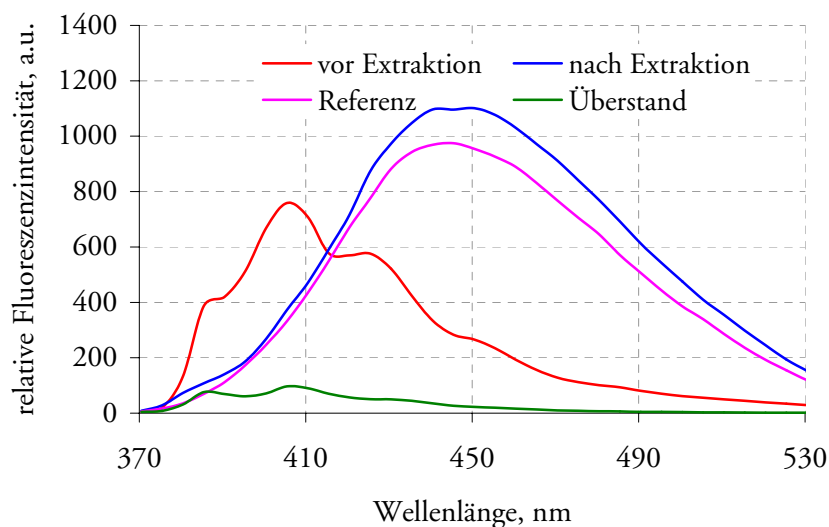
Die Polarität wird hier durch den Reichardtschen Polaritätsindex¹ angegeben. In der Tabelle 4-2 sind die Lösungsmittel zu den Polaritätswerten angegeben.

¹ E_T -Wert

Die gute Übereinstimmung der Fluoreszenzwellenlänge mit der aus der Polaritätsanordnung nach Reichardt zu erwartenden bathochromen Verschiebung zeigt, dass in allen verwendeten Lösungsmittelgemischen ein Austausch der Aceton-Solvathülle zur Solvathülle des Hauptlösemittels erfolgt. Dies gilt ausnahmslos auch in wässriger Lösung. Im Rahmen der stationären Messungen zeigt sich aber, dass die in wässriger Umgebung erreichte Lösungsstruktur nicht stabilisiert ist. Eine sehr langsame Verschiebung des Emissionsmaximum von anfänglich 480 nm auf 410 nm wurde gefunden (Abschnitt 4.2.3).

Eine Degradierung/Dekomposition des Wirtmoleküls in wässriger Umgebung konnte durch Flüssig-Flüssig-Extraktion der wässrigen Lösung in Dichlormethan ausgeschlossen werden. Nach Extraktion in Dichlormethan wurde das strukturlose Emissionsspektrum von 15K5A mit einem Maximum um 440 nm erhalten. Im Vergleich zum Emissionsspektrum von 15K5A gelöst in Dichlormethan sind die Spektren nahezu identisch. In wässriger Phase konnte nach der Extraktion im Vergleich zu vorher eine wesentliche Verringerung der Fluoreszenzintensität festgestellt werden, was durch eine geringere Restkonzentration in Wasser begründet ist (Abb. 4-4).

Abb. 4-4
Vergleichsunter-
suchung durch
Extraktion mit
Dichlormethan



Einfluss pH-Wert

Untersuchungen zum Fluoreszenzverhalten von 15K5A in Abhängigkeit vom pH-Wert der Umgebung wurden ausgehend von einer mindestens 24 h gelagerten wässrigen 15K5A Lösung durchgeführt. In Abb. 4-5 ist das Emissionsverhalten von 15K5A in neutraler Umgebung im Vergleich zu sauren (pH 2) und basischen (pH 12) Bedingungen dargestellt. Im Basischen bleibt das Emissionsspektrum hinsichtlich Bandenlage und -form gegenüber dem neutralen Zustand identisch, jedoch wird eine Intensitätserhöhung beobachtet. In saurer Umgebung wird dagegen eine hypsochrome Verschiebung zu 490 nm sowie das strukturelose Emissionsspektrum erfasst. Des Weiteren ist eine Verringerung der Fluoreszenzintensität zu beobachten.

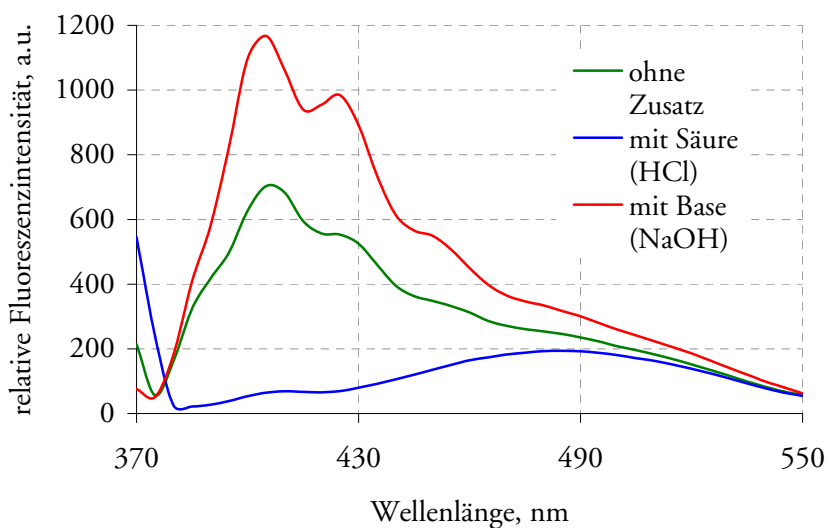


Abb. 4-5
Einfluss des pH-
Wertes auf die
Emission von 15K5A

4.2.3 Wässrige Umgebungsbedingungen

In wässriger Umgebung wurden über einen Zeitraum von 24 h enorm langsame Veränderungen der spektralen Eigenschaften hinsichtlich Bandenlage und -form sowie Änderungen der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit gefunden. In Teilen wurde erste Ergebnisse bereits beschrieben [117].

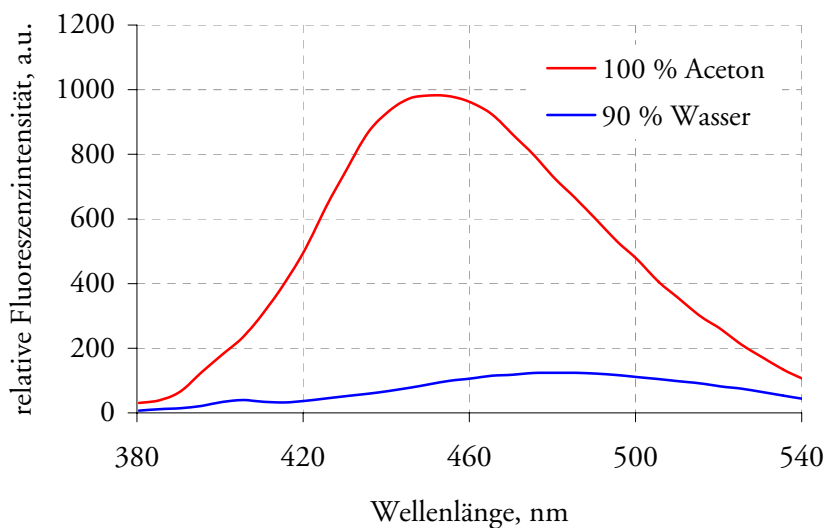


Abb. 4-6
Fluoreszenzspektren
von 15K5A in Aceton
und wässriger Lösung
($c_{15K5A} = 10 \mu\text{mol/l}$,
 $\lambda_{\text{ex.}} = 360 \text{ nm}$,
rot $\lambda_{\text{em.}} = 454 \text{ nm}$,
blau $\lambda_{\text{em.}} = 482 \text{ nm}$)

In saurer Umgebung wird somit ein Emissionsverhalten ähnlich den Ergebnissen in sehr polaren Umgebungen¹ erhalten. In alkalischer bzw. neutraler Umgebung wird hingegen ein davon abweichendes Verhalten² festgestellt, was in Abschnitt 4.2.5 diskutiert wird.

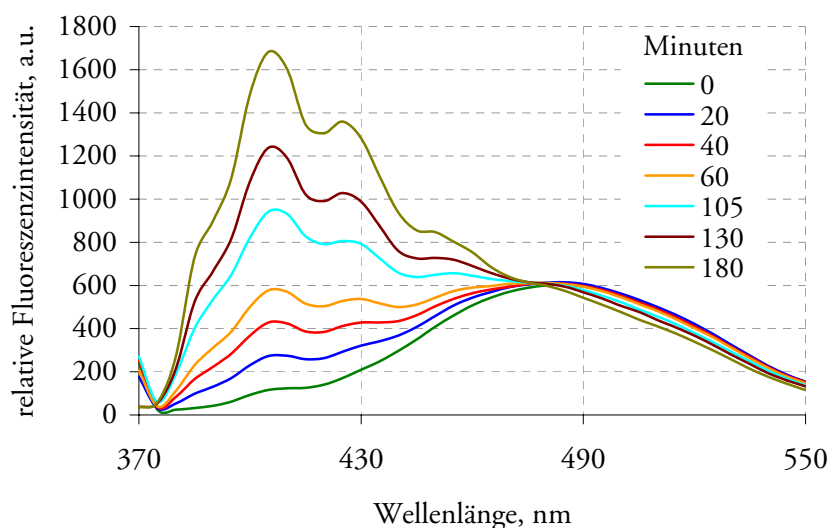
¹nach E_T -Wert

²duale Lumineszenz

Ein Vergleich des Fluoreszenzverhaltens von 15K5A in Aceton und in wässriger Umgebung, nach unmittelbarem Herstellen der Lösungen, im Weiteren bezeichnet als Zeitpunkt Null, ist in Abb. 4-6 dargestellt. In beiden Fällen lässt sich zunächst das strukturlose Emissionsspektrum beobachten. Eine auf die Änderung der Lösemittelpolarität begründete bathochrome Verschiebung um 30 nm im Emissionsspektrum von 15K5A in wässriger Umgebung wird erhalten. Die Intensität, betrachtet im Maximum, ist gegenüber der Aceton-Lösung um das 8-fache verringert. Über einen Zeitraum von 24 h zeigen die experimentellen Befunde in wässriger Umgebung signifikante spektrale Änderungen der Bandenlage und -form sowie im weiteren Zeitverlauf ein Ansteigen der Fluoreszenzintensität bis 24 h.

Eine hypsochrome Verschiebung des Emissionsmaximums um 70 nm auf 410 nm wird nach etwa 90 min erfasst. Im weiteren Zeitverlauf zeigt sich ein stetiges Ansteigen der Fluoreszenzintensität bis zum Erreichen eines stabilen Zustandes nach 24 h. Dieses Verhalten ist in Abb. 4-7 dargestellt. Des Weiteren wurde die verstärkte Ausbildung einer vibronischen Feinstruktur, ähnlich dem Anthracen, gegenüber der strukturlosen breiten Bande zum Zeitpunkt Null beobachtet. Im Fluoreszenzverhalten der Referenzprobe von 15K5A in Aceton wurden über die Zeit keine spektralen Änderungen festgestellt. Ein Vergleich des Fluoreszenzverhaltens von 15K5A in Aceton-Lösung mit einer 24 h gelagerten wässrigen Lösung zeigte, dass spektrale Unterschiede hinsichtlich Bandenlage und -form existieren, jedoch nahezu die gleiche Fluoreszenzintensität beobachtet werden kann. Die Ergebnisse konnten in mehreren Messungen reproduziert werden.

Abb. 4-7
Zeitabhängiges
Verhalten von 15K5A
in wässriger
Umgebung, 10 μM



Kinetische Betrachtung

Die in der Langzeituntersuchung gefundene duale Lumineszenz relaxiert mit Zeitkonstanten von Stunden von der breiten unstrukturierten Komplexbande zur anthracenähnlichen unkomplexierten Fluoreszenzbande. Eine erste kinetische Analyse lieferte hinsichtlich der erhaltenen Änderungen über die Zeit ein multiexponentielles Umwandlungsverhalten. In der Abb. 4-8 sind die erhaltenen Datensätze bezüglich des Grundsignals zum Zeitpunkt Null korrigiert semilogarithmisch an 3 verschiedenen Wellenlängen (390 nm, 410 nm, 430 nm) im anthracenartigen Spektrum gegen die Zeit dargestellt. Im Vergleich dazu ist die abfallende Intensität im Spektrum bei 510 nm betrachtet. Die semilogarithmische Darstellung liefert keine einfache Gerade und somit sind mehrere¹ Zeitkonstanten zu vermuten. Prinzipiell sind die Kurvenverläufe bei den drei dargestellten Wellenlängen ähnlich, was auf ein zu erwartendes einheitliches Transformationsverhalten schließen lässt. Problematisch erscheint jedoch, dass zwar die berechneten Umwandlungsgeschwindigkeiten bei den untersuchten Wellenlängen gleich waren, die jeweiligen Anteile der einzelnen Komponenten aus Auf- und Abbauprozess aber von Wellenlänge zu Wellenlänge stark variierten.

¹mindestens 2

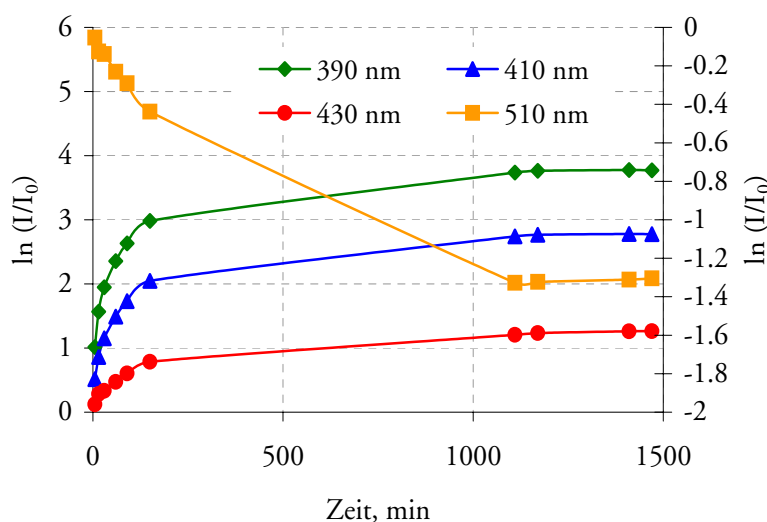


Abb. 4-8
relative
Fluoreszenzintensität
abzüglich dem
Grundsignal
gegenüber der Zeit

Aus diesem Grunde wurde mit einem Kurvenfit bei m-Wellenlängen ($m = 3$) in der ansteigenden Anthracen-Bande und n Wellenlängen ($n = 2$) in der abfallenden Komplex-Bande versucht, die Anteile von gegenläufigen spektralen Anteilen aus den Kurvenverläufen zu korrigieren. Dazu wurden die zeitabhängigen Änderungen der Spektren $S(\tau, \lambda)$ durch eine Summe von Prozessen erster Ordnung modelliert und mathematisch durch eine Summe von Exponentialfunktionen dargestellt.

Gleichung 4-1

$$F(\lambda_i, t) = \sum_{i=1}^m a(\lambda_i, t) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau(\lambda_i)}\right) + \sum_{i=m+1}^{m+n} b(\lambda_i, t) \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau(\lambda_i)}\right)\right]$$

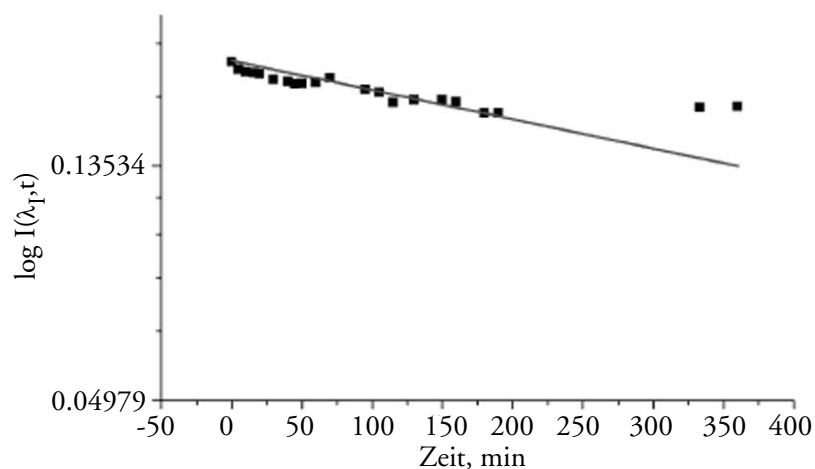
Die $\tau(\lambda_i)$ repräsentieren dabei die Lebensdauern der Komponente i . Der erste Term enthält den ansteigenden Anteil der spektralen Veränderungen, während der zweite Term den abfallenden Spektralanteil repräsentiert. Die Spektralfunktionen werden mit Linienbreitenfunktionen $G(\lambda_i, \lambda)$ gefaltet, um eine optimale Spektrenanpassung zu erhalten.

Gleichung 4-2

$$I(\lambda, t) = \sum_i F(\lambda_i, t) \cdot G(\lambda_i, \lambda)$$

Man erhält dann eine Fit-Funktion, mit der man die experimentellen Umwandlungskinetiken iterativ durch die Fit-Funktion anpasst. Im Ergebnis erhält man eine Abklingzeit für jede Wellenlänge im abfallenden sowie im ansteigenden Spektralintervall. Unterschiede in den gefundenen Lebensdauern weisen auf Prozesse höherer Ordnung hin. Bei den hier gefitteten Umwandlungskinetiken wurde für alle Wellenlängen in der ansteigenden Anthracenbande eine Umwandlungszeitkonstante von 180 Minuten gefunden. Diese stimmt darüber hinaus sehr gut mit der in der abfallenden Komplexbande gefundenen Umwandlungszeitkonstante überein. Wie in Abb. 4-9 gezeigt, liegen die korrigierten Datenpunkte der abfallenden Bande bis zu 200 Minuten exakt auf einer Geraden im semilogarithmischen Plot. Bei sehr langen Zeiten hingegen wurden systematische Abweichungen beobachtet. Ein multiexponentielles Verhalten wie in den ersten kinetischen Analysen der unkorrigierten Spektren angedeutet, konnte nicht bestätigt werden.

Abb. 4-9
Semilogarithmischer
Plot der abfallenden
Komplexbande bei
510 nm



Fluoreszenzverhalten in Umgebungen von Ethanol und 2-Propanol im Vergleich zur wässrigen Lösung

Im Vergleich zur wässrigen 15K5A-Lösung wurde das Fluoreszenzverhalten von 15K5A in weiteren Lösungsmitteln mit höherem E_T -Wert als Aceton untersucht. Dazu wurden Lösungen in Ethanol und 2-Propanol, analog zu wässrigen Lösungen hergestellt und über einen Zeitraum von 18 h beobachtet.

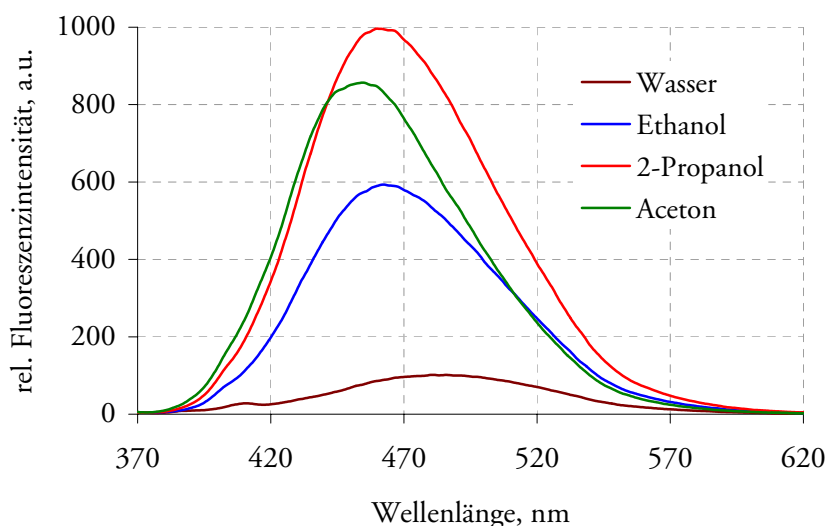


Abb. 4-10 a)
Polaritätsabhängige
Umgebungsbe-
dingungen, 10 μ M,
Zeitpunkt 0h

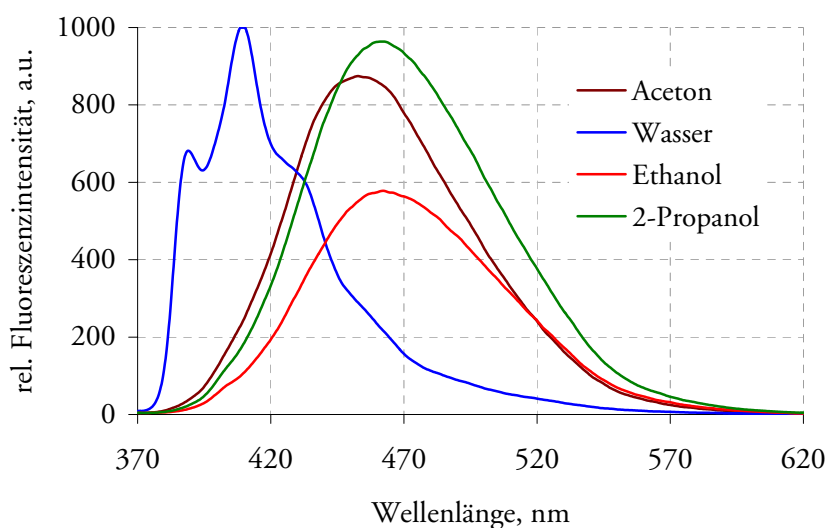


Abb. 4-10 b)
Polaritätsabhängige
Umgebungsbe-
dingungen, 10 μ M,
Zeitpunkt 18h

Die Abb. 4-10 a) und b) zeigen, dass Änderungen im Fluoreszenzverhalten nur in wässriger Umgebung auftreten. Verdeutlicht wird dies auch anhand der in Tabelle 4-3 dargestellten Wellenlängenverschiebung bezogen auf den Ausgangszustand sowie einem Faktor berechnet aus der Intensität nach 18 h durch die Intensität zu Beginn der jeweiligen Messung.

Tabelle 4-3
Veränderungen des
Emissionsverhaltens
unter verschiedenen
Bedingungen

	Aceton	Wasser	Ethanol	2-Propanol
Wellenlängenverschiebung bezogen auf Zeitpunkt Null, nm	-2	-72	0	1.5
Verstärkungsfaktor bezogen auf Zeitpunkt Null	1.02	9.83	0.97	0.97

Fluoreszenzverhalten von 9-Anthracencarbonsäure in wässriger Umgebung

Zur Lokalisierung des gefundenen Effektes wurde die 9-ANTC im Vergleich zum 15K5A in wässriger Lösung untersucht. Die bereits von 15K5A bekannten spektralen Änderung hinsichtlich Bandenlage und -form sind hier ebenso beobachtet worden. Die Umwandlungszeiten liegen jedoch nicht im Bereich von Stunden. Im Rahmen der durchgeführten statischen Messungen konnte aufgrund der Schnelligkeit des Prozesses keine Zeitkonstante bestimmt werden. Die langsame Transformation von 15K5A kann somit nicht auf das Verhalten der 9-ANTC zurückgeführt werden.

Fluoreszenzverhalten konformativ ähnlicher Substanzen in wässriger Umgebung

Einen weiteren Ansatzpunkt zur Klärung der enorm langsamen spektralen Änderungen im Emissionsspektrum von 15K5A in wässriger Umgebung wurde anhand des Fluoreszenzverhaltens strukturell ähnlicher Substanzen in wässriger Lösung untersucht. Einbezogen wurden die Wirtverbindungen 15K5A-Br und 15K5A-O, die in ihren spektralen Grundeigenschaften im Anhang dargestellt sind. Es handelt sich dabei um Wirtverbindungen, die wie 15K5A 9-ANTC als chromophore Einheit enthalten.

Eine Gegenüberstellung des Fluoreszenzverhaltens zunächst in Acetonlösungen von 15K5A und 15K5A-O zeigte nahezu völlige Übereinstimmung sowie im Absorptions- als auch im Emissionsverhalten. Dagegen wurden im Emissionsspektrum von 15K5A-Br in Aceton bereits vibronische Feinstrukturen erkennbar. Das Emissionsmaximum befindet sich bei allen drei Verbindungen bei 454 nm. Analog der Vorgehensweise von 15K5A wurden die Untersuchungen in wässriger Lösung durchgeführt.

a) Fluoreszenzverhalten 15K5A und 15K5A-Br in wässriger Umgebung

Das Wirtmolekül 15K5A-Br unterscheidet sich zur Struktur von 15K5A durch Bromierung an Position 10 der Anthraceneinheit. Die Abb. 4-11 gibt das Fluoreszenzverhalten von 15K5A-Br im Vergleich mit 15K5A in wässriger Umgebung nach folgenden Zeiten: a) 2 min, b) 20 min und c) 1440 min (24 h) wieder.

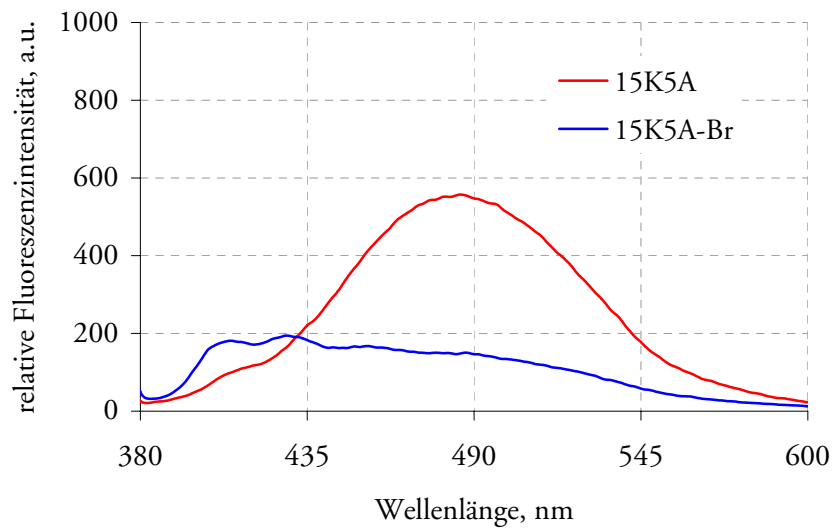


Abb. 4-11 a) 2 min
zeitliches Verhalten in
wässriger Umgebung

$$\lambda_{\max 15K5A}=485\text{nm}$$

$$\lambda_{\max 15K5A-Br}=430\text{nm}$$

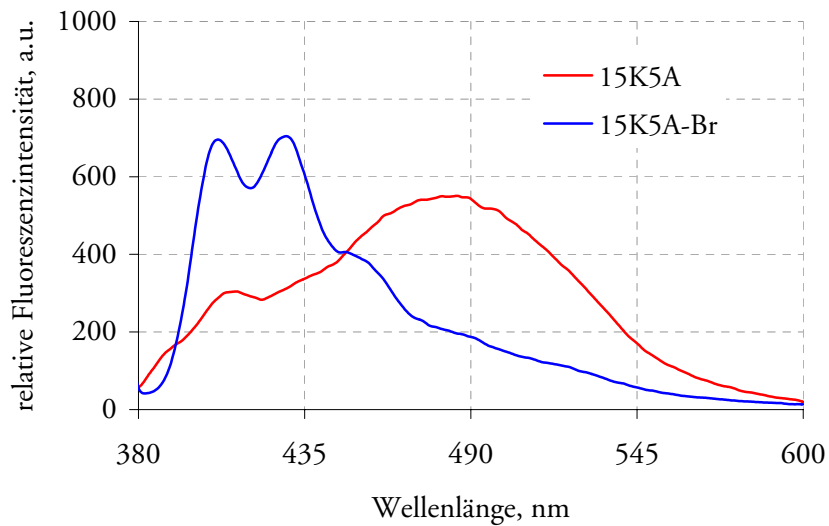


Abb. 4-11 b) 20 min
zeitliches Verhalten in
wässriger Umgebung

$$\lambda_{\max 15K5A}=485\text{nm}$$

$$\lambda_{\max 15K5A-Br}=430\text{nm}$$

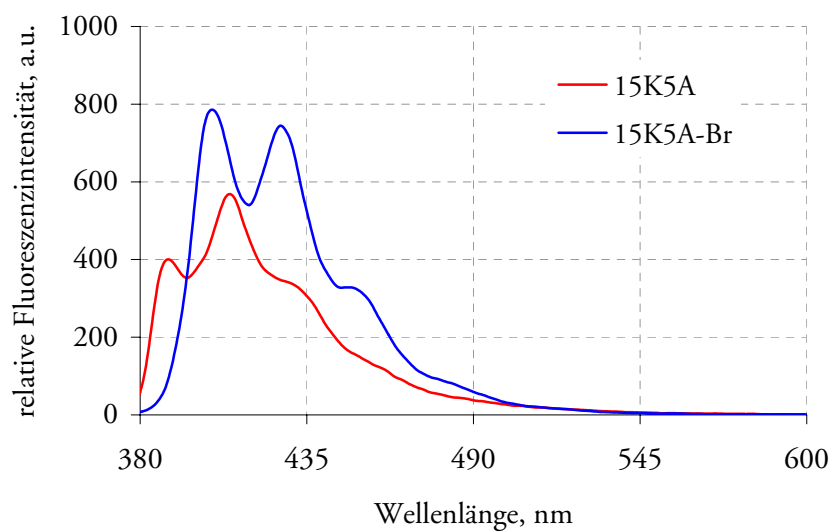


Abb. 4-11 c) 1440 min
zeitliches Verhalten in
wässriger Umgebung

$$\lambda_{\max 15K5A}=410\text{nm}$$

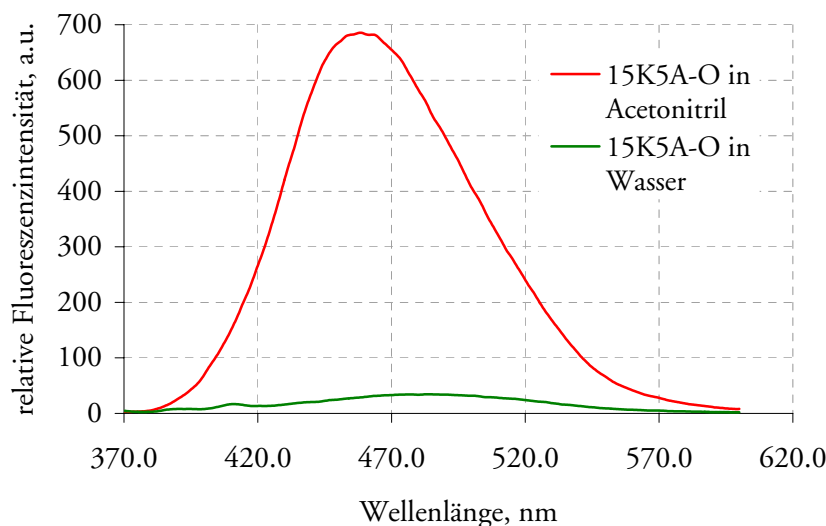
$$\lambda_{\max 15K5A-Br}=405\text{nm}$$

Die vom 15K5A bereits bekannten spektralen Veränderungen der Bandenlage und -form sind im Emissionsspektrum des Wirtmoleküls 15K5A-Br deutlich schneller zu beobachten. Während die Ausbildung vibronischer Strukturen im Emissionsspektrum von 15K5A erst nach ca. 20 min langsam erkennbar wird, sind diese im bromierten 15K5A-Br bereits 2 min nach Herstellung der wässrigen Lösung zu beobachten. Ebenso kann zu diesem Zeitpunkt eine hypsochrome Verschiebung des Emissionsmaximums auf 430 nm festgestellt werden. Nach 24 h wird im Emissionsspektrum von 15K5A-Br eine deutlich ausgeprägte strukturierte Bandenform mit einem Emissionsmaximum bei 405 nm nachgewiesen. Dagegen liegt das Maximum im Emissionsspektrum von 15K5A bei 410 nm. Gemeinsam ist beiden Substanzen, dass ein stabiler Zustand erst nach 24 h erreicht wird.

b) Fluoreszenzverhalten 15K5A und 15K5A-O in wässriger Umgebung

Strukturell unterscheidet sich 15K5A-O von 15K5A durch einen offenen Kronenether anstelle des geschlossenen Ringsystems. Das Fluoreszenzverhalten beider Wirtmoleküle in Aceton ist gleich. In wässriger Umgebung hingegen wurden im Fluoreszenzverhalten von 15K5A-O über einen Zeitraum von 24 h keine spektralen Veränderungen in Richtung anthracenähnlichem Spektrum beobachtet. Eine strukturlose breite Bande bleibt erhalten, die aufgrund der geänderten Polarität um ca. 20 nm langwellig verschoben ist. Die Fluoreszenzintensität in wässriger Umgebung ist im Gegensatz zur Aceton-Lösung um das 20-fache verringert (Abb. 4-12).

Abb. 4-12
Vergleich der
Emission von
15K5A-O nach 24 h



c) Fluoreszenzverhalten 15K5A und 2-15K5A in wässriger Umgebung

Die durch Substitution von zwei Kronenethereinheiten an einer Anthraceneinheit synthetisierte Verbindung 2-15K5A wird zum Vergleich des Fluoreszenz-

verhaltens in wässriger Umgebung für eine nicht an Position 9 substituierten Verbindung herangezogen. Dabei wurden über einen Zeitraum von 24 h keine Fluoreszenzänderungen analog 15K5A festgestellt. Änderungen im Fluoreszenzverhalten dieser Verbindung werden lediglich durch die höhere Polarität der Umgebung hervorgerufen und resultieren in einer bathochromen Verschiebung sowie geringeren Fluoreszenzintensität gegenüber dem Ausgangssignal (Abb. 4-13).

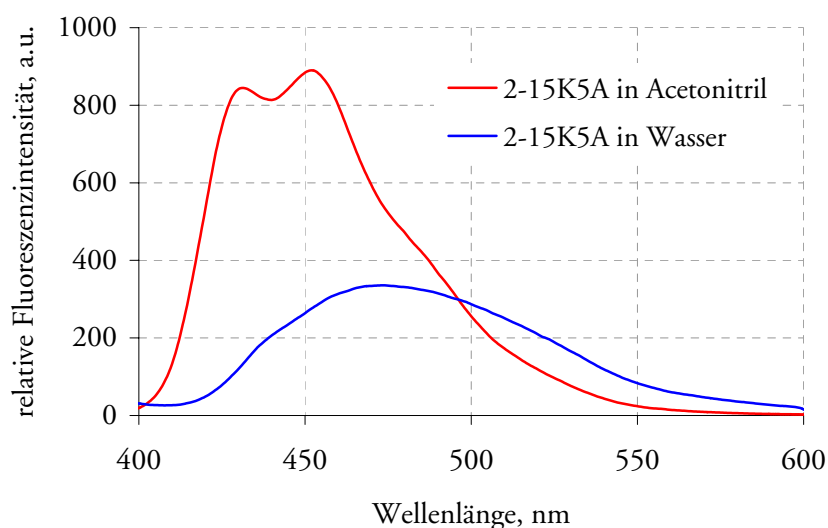


Abb. 4-13
Vergleich der
Emission von 2-15K5A
nach 24 h

Zusammenfassung der Untersuchungen strukturell ähnlicher Substanzen von 15K5A

In Tabelle 4-4 sind die Ergebnisse der Untersuchungen in wässriger Lösung zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 4-4
Ergebnisse der
Untersuchung in
wässriger Lösung

Molekül	15K5A	15K5A-Br	15K5A-O	2-15K5A	9-ANTC
Struktur					
Spektrale Änderungen					
- über die Zeit	nach 90 min	nach 20 min	keine	keine	sofort
- Bandenlage	408 nm	405 nm			400 nm
- Bandenform	strukturiert	strukturiert			strukturiert

4.2.4 NMR-spektroskopische Charakterisierung

¹räumliche

Untersuchungen intermolekularer Einflüsse von Kronenether und Anthraceneinheit wurden mit Hilfe der NMR-Spektroskopie in deuteriertem Chloroform durchgeführt. Zur Charakterisierung wurden neben der Aufnahme des Protonenspektrums verschiedene weitere Verfahren, wie H-H-COSY, HMBC, HSQC in die Untersuchungen einbezogen. Dabei wurde gezeigt, dass es sich in jedem Fall nicht um eine sterische, konformativ bedingte¹ Behinderung des Kronenethers zum Anthracen handelt. Chelatkomplexe von Kronenether- und Anthraceneinheit konnten nicht nachgewiesen werden. [117]

In Anbetracht des komplexen Fluoreszenzverhaltens von 15K5A in wässriger Lösung wurden NMR-Untersuchungen ebenfalls im wässrigen System durchgeführt. Das Wirtmolekül 15K5A-O wurde aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit, aber komplett anderen Fluoreszenzverhaltens in wässriger Lösung in die Untersuchungen einbezogen. Von beiden Verbindungen wurden jeweils direkt nach Herstellung der wässrigen Lösung sowie nach einer Standzeit von 24 h Protonenspektren aufgenommen. Die Ergebnisse unterstützen die aus den Fluoreszenzmessungen erhaltenen Erkenntnisse. Die Verbindung 15K5A-O zeigte über die Zeit keine Änderungen im Spektrum. In den Spektren von 15K5A hingegen sind nach 24 h deutliche Änderung gegenüber dem Ausgangszustand beobachtet worden.

4.2.5 Diskussion der Ergebnisse

Die experimentellen Befunde der Kronenetherverbindung 15K5A zeigen interessante spektrale Eigenschaften. In Grundzügen sind bereits erste Ansätze dargestellt worden [117]. Ausgehend von den gefundenen Besonderheiten wurden die Untersuchungen zur fluoreszenzspektroskopischen Charakterisierung erweitert. Die Aufklärung dieser Grundeigenschaften ist für die potentielle Anwendung in der Sensorik von enormem Interesse. Auf der Basis der Absorptions- und Fluoreszenzspektren von 15K5A im Vergleich zu Anthracen und 9-ANTC werden die experimentellen Daten diskutiert. Zur Klärung der enorm langsamen Transformation von 24 h in den Emissionsspektren von 15K5A in wässriger Lösung werden strukturell ähnliche Kronenetherverbindungen in die Diskussion einbezogen. Weiterführend dienten zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen sowie NMR-spektroskopische Untersuchungen der Ursachenfindung.

Absorptionsverhalten von 15K5A im Vergleich zu Anthracen und 9-Anthracencarbonsäure

²nachHückel $4n+2$
[115]

Das für Anthracen typische Absorptionsspektrum mit einer Bande um 265 nm und einer strukturierten π -Bande zwischen 330 und 410 nm in Aceton konnte nachgewiesen werden. Dem konjugierten System von Anthracen liegt ein delokalisiertes π -Elektronensystem aus 14π -Elektronen² zugrunde. Die im Vergleich zum Anthracen gefundene bathochrome Verschiebung der Absorp-

tionsspektren von 9-ANTC sowie 15K5A um 5 nm lässt sich im Wesentlichen auf die Carbonylgruppe zurückführen. Das π -Elektronensystem des Anthracens wird durch Zuführung des weiteren π -Elektrons der Carbonylgruppe vergrößert. Damit nimmt die einzubringende Energie, ein Elektron in einen elektronisch angeregten Zustand zu bringen ab, was in einer bathochrome Verschiebung resultiert. Des Weiteren sind die Absorptionsspektren von 9-ANTC und 15K5A hinsichtlich ihrer Bandenstruktur weniger stark ausgeprägt. Die "Schultern" der typischen Anthracenstruktur im Absorptionsspektrum sind nicht mehr vorhanden, sowie eine breitere Bandenstruktur ist erkennbar. Es ist anzunehmen, dass durch die Substitution am Anthracen die Querausdehnung des Elektronensystems gehemmt wird, was in der festgestellten weniger strukturierten Bandenform resultiert.

Des Weiteren konnten keine konzentrationsabhängigen Änderungen im Absorptionsspektrum von 15K5A gefunden werden. Das Vorhandensein von Dimeren und Excimeren wird somit ausgeschlossen.

Fluoreszenzverhalten von 15K5A im Vergleich zu Anthracen und 9-Anthracencarbonsäure

Im Gegensatz zu den geringen Änderungen im Absorptionsverhalten wurden wesentliche Unterschiede im Fluoreszenzverhalten von 15K5A, 9-ANTC und Anthracen erfasst. Das aus der Literatur bekannte Emissionsspektrum von Anthracen spiegelbildlich zur Anregung wird in den beiden anderen Verbindungen 9-ANTC und 15K5A nicht beobachtet. Eine strukturlose zum Anthracen um 50 nm bathochrom verschobene Emissionsbande wird sowohl bei 9-ANTC als auch 15K5A erhalten. Wesentlicher Unterschied dabei ist die 5,5-fache geringe Intensität von 15K5A gegenüber 9-ANTC während 9-ANTC und Anthracen bezüglich des Emissionsmaximums die gleiche Fluoreszenzintensität zeigen.

Es ist anzunehmen, dass durch die Substitution der Position 9 am Anthracen zur 9-ANTC sowohl eine Elektronendonator- als auch eine Elektronenakzeptoreinheit in einem Molekül geschaffen wurden. Ausgehend von den relativ kleinen Änderungen im Absorptionsverhalten weisen die signifikanten Unterschiede im Fluoreszenzverhalten auf das Vorhandensein solcher Donor-Akzeptor-Komplexe hin.

Die weitere Substitution der 9-ANTC mit einer über eine Methyleneinheit verbundenen Benzo-15-Krone-5-Einheit führt wie bereits beschrieben im Vergleich zur 9-ANTC zu einer deutlich verringerten Fluoreszenzintensität. Dies kann vermutlich auf die veränderten Verhältnisse zwischen Donor- und Akzeptoreinheit zurückgeführt werden. Durch Einbringen der Benzo-15-Krone-5 liegen zwei chromophore Einheiten im Molekül vor. Somit kann das Molekül 15K5A als bimolekularer Komplex bezeichnet werden. Der Einfluss auf das Fluoreszenzspektrum zeigt sich in einem gekoppeltem Chromophorsystem mit weitestgehender Konjugation. Es werden ähnlich der 9-ANTC Charge-Transfer-Übergänge das Fluoreszenzverhalten der Wirtverbindung beeinflussen. Prinzipiell gilt, dass die Fluoreszenz von 15K5A und 9-ANTC aus einem Zustand erfolgt, der nicht der absorbierende Zustand ist.

Fluoreszenzverhalten in Abhängigkeit von der Umgebung

Fluoreszenzmessungen sind in großem Maße abhängig von Änderungen der Umgebung wie z.B. Lösungsmittelzusammensetzung und pH-Wert. Demzufolge wurde das Fluoreszenzverhalten von 15K5A hinsichtlich der Umgebungsabhängigkeit geprüft. Für die Anwendung als sensoraktive Substanz ist dies eine wichtige Voraussetzung, um sicherzustellen, dass es sich nicht um Lösungsmittelleffekte bzw. pH-Wert abhängige Änderungen der Messwerte handelt.

In Abhängigkeit von der Polarität des Lösungsmittels wurde eine Verschiebung der Wellenlänge zwischen 440 nm und 480 nm gefunden. Mit steigender Polarität des Lösungsmittels, ausgehend vom Reichardtschen Polaritätsindex, verschiebt sich dabei das Emissionsmaximum bathochrom. Ein entsprechender Zusammenhang zwischen E_T -Wert des Lösungsmittels und dem Emissionsmaximum ist tendenziell erkennbar und lässt eine positive Solvatochromie vermuten. Je nach Verschiebung wird zwischen positiver, d.h. mit steigender Polarität wird die Emissionsbande bathochrom verschoben, und negativer Solvatochromie, hypsochrome Verschiebung, unterschieden. Dies lässt sich durch die unterschiedliche Auswirkung auf $\pi \rightarrow \pi^*$ und $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge in Abhängigkeit von der Lösungsmittelpolarität erklären. In polarer Umgebung wird der π^* -Zustand energetisch stärker abgesenkt als der π -Zustand und damit durch den geringeren Energieunterschied des $\pi \rightarrow \pi^*$ -Überganges die Anregungsenergie erniedrigt, was in einer bathochromen Verschiebung resultiert. Damit folgt das Emissionsmaximum dem zu erwartenden Trend.

Eine Ausnahme bildet jedoch das Fluoreszenzverhalten von 15K5A in wässriger Lösung. Eine enorm langsame Änderung der spektralen Eigenschaften hinsichtlich Bandenlage und -form sowie Fluoreszenzintensität bis zum Erreichen eines stabilen Zustandes nach 24 h wurde beobachtet. Dies ist nicht allein durch die Polarität der Umgebung erklärbar. Im Vergleich wurde das Fluoreszenzverhalten der 9-ANTC in wässriger Lösung betrachtet. Die Ausbildung einer anthracenähnlichen Struktur aus einer breiten bathochrom verschobenen Bande wird ebenfalls beobachtet und als duale Lumineszenz bezeichnet. Der Zeitraum der Umwandlung wird in wenigen Nano- bis Millisekunden vermutet, da mit statischen Fluoreszenzmessungen keine zeitabhängigen Änderungen des Spektrums zu beobachten waren.

Das Auftreten dualer Lumineszenz von 9-ANTC ist je nach Polarität bzw. protischen und nicht-protischen Lösungsmitteln durch Ghonheim et al. beschrieben [118]. Die Möglichkeit, dass zwei verschiedene spektroskopische Zustände im angeregten Zustand zu verschiedenen fluoreszierenden Deaktivierungsmöglichkeiten führen, wurde bereits durch Lippert als anormale Fluoreszenz an einer Diaminobenzonitril-Lösung beschrieben [119]. Visser und Varma [120] zeigen in einem Solute-Solvent-Komplex, dass die durch das Lösungsmittel induzierte Wellenlängenverschiebung mit den dielektrischen Eigenschaften des Lösungsmittels korreliert.

Schematisch ist das Ghonheim-Modell in Abb. 4-14 für das 9-carboxy-substituierte Anthracen dargestellt.

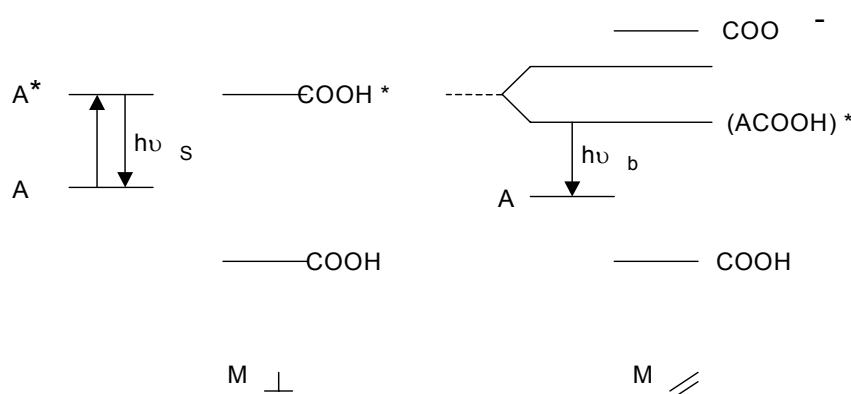


Abb. 4-14
Energiediagramm-
Schema eines
9-carboxy-
substituierten
Anthracens

Erklärt wird dieser Effekt durch die Existenz sowohl eines parallelen als auch perpendicularen Zustandes von 9-ANTC. Der senkrechte Zustand ist entkoppelt, was zu einer vollständigen Ladungstrennung führt. Dadurch wird das Dipolmoment im angeregten Molekül erhöht und eine starke Stabilisierung in polaren protischen Lösungsmitteln erreicht. Aus diesem Grunde wird das anthracentypische Verhalten in Absorption und Fluoreszenz beobachtet. Unterschiede der Dipolmomente zwischen koplanarem und perpendicularen System führen zu unterschiedlich starker Stabilisierung der angeregten Zustände durch das Lösungsmittel und damit zu zwei Banden im Emissionsspektrum. Der parallele Zustand wird als gekoppelter Zustand des 9-ANTC beschrieben, was in einer bathochrom verschobenen unstrukturierten Fluoreszenz resultiert.

Im Potentialbild liefert dies einen fast barrierelosen Übergang aus dem entkoppelten absorptiven Zustand in den gekoppelten emissiven Zustand.

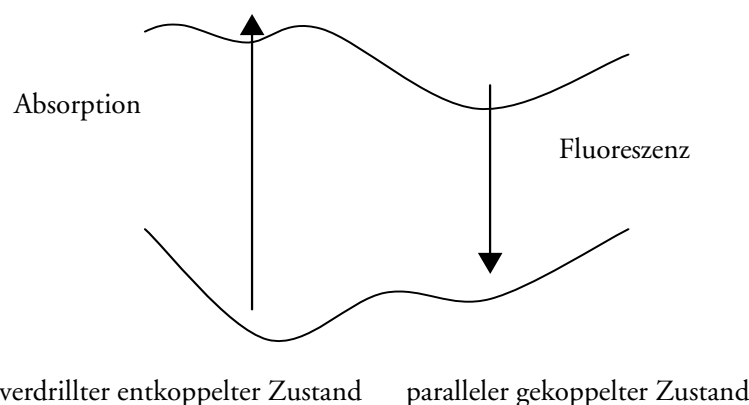


Abb. 4-15
Potentialbild mit
Übergängen im
entkoppelten und
gekoppelten Zustand

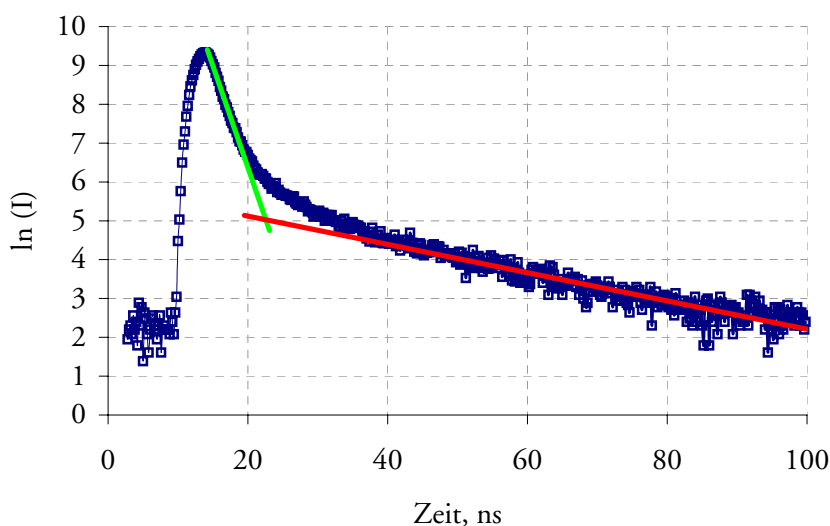
Im Grundzustand erfolgt bei 9-ANTC wie auch bei 15K5A in verschiedenen Lösungsmitteln¹ ein ebenfalls sehr schneller fast barriereloser Übergang in den entkoppelten absorptiven Grundzustand. Beim 9-ANTC findet man in

¹z.B. Acetonitril

Lösungsmitteln hoher Polaritäten sowie im basischen Bereich um pH 12 Emission aus dem verdrillten Zustand. Das bedeutet, die Barriere im angeregten Zustand steigt. Die Kopplung ist aufgrund der polaren Lösungsmittelwechselwirkung mit einem tieferen Potentialminimum im angeregten Zustand verbunden, die einen Übergang in den gekoppelten Zustand erschwert. Im Rahmen der Arbeit wurden exemplarisch zeitaufgelöste fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen mit 15K5A in verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt. Aufgrund der für die verschiedenen Prozesse relevanten Zeitkonstanten wurden die Untersuchungen mit verschiedenen Methoden und den jeweiligen Auflösungen durchgeführt. Gemessen wurden sowohl die Fluoreszenzlebensdauern mit einer SPC an der TU Clausthal¹ und an der FSU Jena² in Acetonitril, die die Fluoreszenz des gekoppelten Zustandes als auch in wässrigen Lösungen, die Fluoreszenz des entkoppelten Zustandes zeigen.

¹Institut für
Physikalische Chemie
²Institut für
Physikalische Chemie

Abb. 4-16
Semilogarithmischer
Plot einer SPC-
Messung von 10 μ M
15K5A wässrigen
Lösung bei Detektion
der Anthracenbande
(400 nm),
 $\tau_1 = 1,9$ ns
 $\tau_2 = 27,5$ ns



Der erhaltene doppelt-exponentielle Abfall (Abb. 4-16) mit einer relativ kurzen Lebensdauer von 1,9 ns und einer langlebigen Komponente von 27,5 ns weist auf eine komplexere Struktur der Verhältnisse im angeregten Zustand hin, als in Abb. 4-14 skizziert. Interessanterweise zeigen die Messungen, dass die kurzlebige Komponente fast unabhängig von Lösungsmittel und Zugabe von Ionen ist. Dagegen wird die langlebige Komponente bei Zugabe z. B. von KClO_4 um etwa einen Faktor 2 verkürzt. Vermutlich erfolgt ein Teil der Fluoreszenz direkt aus einem nicht völlig relaxierten Zwischenzustand des entkoppelten Systems. Eine andere Möglichkeit ist, dass die langlebige Komponente aus einem teilweisen verdrillten Zustand³ erfolgt, der in Abhängigkeit von den Umgebungseffekten mehr oder weniger stabilisiert wird. Eine solche Deaktivierung durch Emission würde eine wesentlich längere Lebensdauer als die des Anthracens⁴ erklären, während die kurzlebige Komponente in Übereinstimmung mit der geringeren Fluoreszenzquantenausbeute des komplexierten Anthracens der Anthracen-Fluoreszenz entspricht.

³vermutlich 45°

⁴5,2 ns in Cyclohexan
[44]

Die SPC-Messungen zum Fluoreszenzverhalten von 15K5A in Aceton in der Fluoreszenzbande des gekoppelten Zustandes, die an der FSU Jena durchgeführt wurden, zeigen sehr ähnliche Ergebnisse. So wurde bei einer Anregung bei 363 nm und der Messung der Emission bei 454 nm ein mehrfachexponentieller Abfall gefunden. Die kurzlebige Komponente von 1,3 ns hat dabei ein Gewicht von 78 %, die langlebige Komponente mit 9 ns ein vergleichsweise geringes Gewicht von 22 %. Auch hier zeigt sich, dass die kurzlebige Komponente kaum beeinflusst wird, während die langlebige Komponente offensichtlich von den sterischen Bedingungen und damit der partiellen Ladungsverschiebung abhängig ist.

Insbesondere die Ergebnisse an der FSU Jena ließen aufgrund des Abfallverhaltens der SPC-Meßkurven darauf schließen, dass evtl. noch kurzlebigere Spezies zu erwarten sind, was sehr gut zur starken Fluoreszenzlöschung im komplexierten System gegenüber des Anthracen korrelieren würde. Aus diesem Grunde wurde nach Möglichkeiten gesucht, zeitaufgelöste Fluoreszenz- bzw. Absorptionsmessungen mit wesentlich höherer Zeitauflösung durchzuführen. Diese Messungen¹ wurden an der Universität Frankfurt² mit Hilfe eines Ti:Saphir-Pump-and-Probe-Spektrometers durchgeführt. Die dargestellten Spektren von 15K5A in Aceton (Abb. 4-17) und 15K5A in wässriger Lösung (Abb. 4-18) liefern sowohl transiente Absorptionssignale als auch stimulierte Fluoreszenz. Dabei ist in der 2D-Darstellung³ grün der Nullpunkt, blau die Emission und rot die Absorption. Die zeitliche Skalierung ist von 0-1 ps linear und danach logarithmisch. Der Zeitpunkt Null ist durch Dispersion über den Wellenlängenbereich etwas verschoben. Die Spektren wurden wegen der begrenzten optischen Verschiebemöglichkeit bis zu einer maximalen Verzögerung von 1 ns aufgenommen. Außerdem zeigten alle gefundenen Effekte, sowohl transiente Absorptionen als auch verstärkte Fluoreszenzsignale, Zeitkonstanten, die wesentlich unter 1 ns lagen⁴.

¹zeitaufgelöste
transiente

Absorptions-
spektroskopie

²Institut für
Physikalische Chemie

³42 Kanäle in der
Wellenlänge, 8 nm pro
Kanal

⁴maximal 200 ps

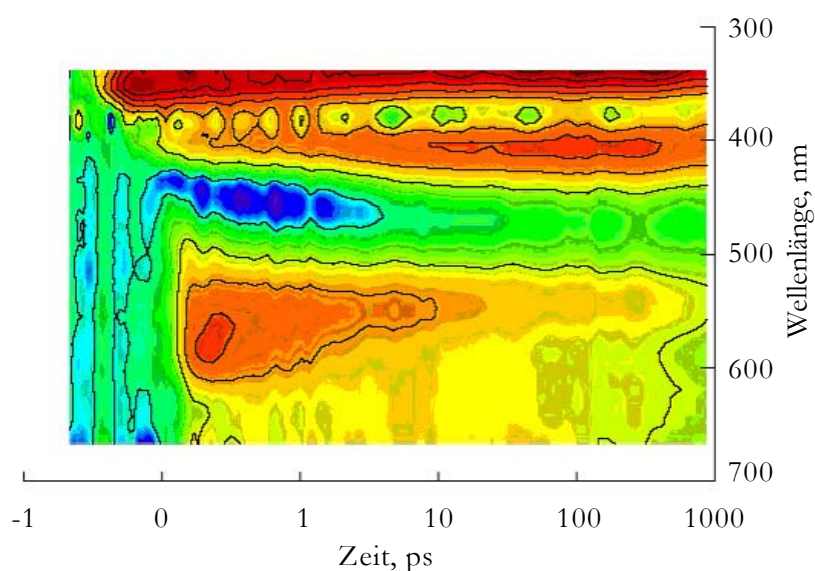
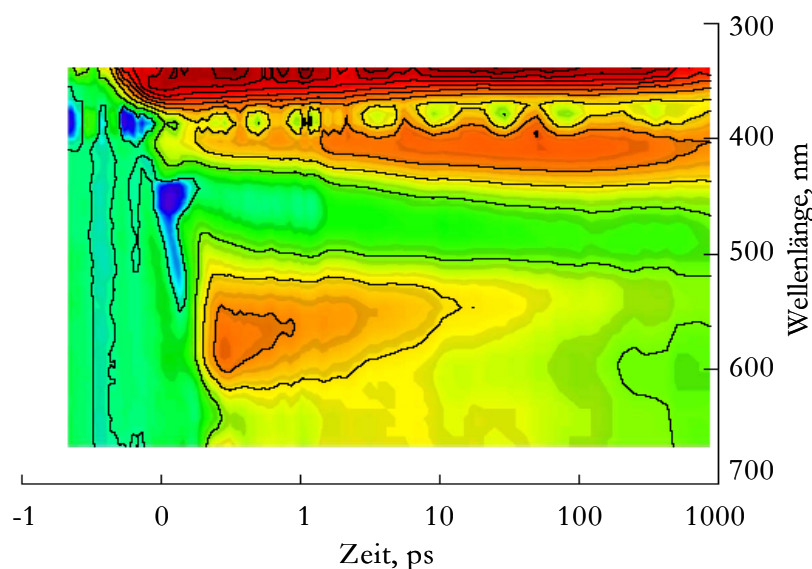


Abb. 4-17
15K5A in Aceton
2D-Kurzzeitspektrum

Das transiente Absorptionsspektrum von 15K5A in Aceton weist eine extrem kurze Fluoreszenzkomponente bei ca. 450 nm im Zeitbereich von 10 ps auf. Dies weist darauf hin, dass die Fluoreszenzkinetik noch komplexer als aus den ns-Lebensdauer-messungen angenommen ist. Daneben treten transiente Absorptionen sowohl bei 400 nm als auch bei 550 nm auf. Es wird vermutet, dass es sich bei der transienten Absorption um 550 nm um eine Excited-State-Absorption handelt, insbesondere da in diesem Wellenlängenbereich keinerlei transiente Fluoreszenz zu finden ist. Die transiente Absorption um 400 nm ist dem Absorptionsspektrum des entkoppelten Systems zugeordnet, die Ursache für diese transiente Absorption in Aceton ist noch unklar, und wird weiteren Untersuchungen unterzogen. Möglicherweise können auch zwei verschiedene Grundzustände mit völlig identischem Absorptionsverhalten existieren [121]. In wässriger Umgebung fehlt im 15K5A eine dem Aceton-System vergleichbare Fluoreszenzkomponente. Sie ist weder, wie in wässriger Lösung, bei 450 nm noch, wie zu erwarten war, um die 400 nm in der Anthracen-Bande zu finden. Andererseits ist aber auch die transiente Absorption im Bereich von 400 nm wesentlich schwächer als im Aceton.

Abb. 4-18
15K5A in wässriger
Lösung nach 24 h,
2D-Kurzzeitspektrum



Neben den zeitaufgelösten Fluoreszenzuntersuchungen im Kurzzeitbereich wurden, wie in Abschnitt 4.2.3 erläutert, Langzeituntersuchungen an 15K5A in wässriger Lösung durchgeführt. Dabei wurde mit Hilfe gefitteter Umwandlungskinetiken für alle Wellenlängen in der ansteigenden Anthracenbande eine Umwandlungszeitkonstante von 180 min gefunden. Dies korreliert sehr gut mit der Umwandlungszeitkonstante in der abfallenden Komplexbande bei 510 nm. Eine Interpretation der gefundenen kinetischen Spektralverläufe muß vor allem nach den Ursachen einer solch extrem verzögerten Rückkehr in einen Zustand, der offensichtlich dem Gleichgewichtszustand des 15K5A entspricht, fragen. Wie gezeigt wurde, konnten alle zu erwartenden Ursachen wie Degradation (Abschnitt 4.2.2) und intramolekulare Komplexbildung zwischen Kronenethering und Anthracenring (Abschnitt 4.2.4) ausgeschlossen werden. Sicher

ist, dass es sich hier um eine extrem verzögerte Relaxation aus dem parallelen komplexierten Zustand in den verdrehten unkomplexierten Zustand handelt.

Wünschenswert wäre es, die Untersuchungen der Rückkehr in die unkomplexierte Bande auch bei anderen Lösungsmitteln zu untersuchen, um Viskositätsabhängigkeiten oder andere Lösungsmittelleffekte auf die Zeitkonstante in die Diskussion zur Ursachenfindung dieses Effektes einzubeziehen. Leider ist es bis jetzt nicht gelungen, diesen Effekt in anderen als im wässrigen Lösungsmittel nachzuweisen.

Die Möglichkeit sterischer Behinderungen des chromophoren Systems durch den Kronenether wurde anhand durchgeführter NMR-spektroskopischer Untersuchungen ebenfalls weitestgehend ausgeschlossen. Die Auswertung der NOESY-Spektren zeigt keine Kopplung der Anthracen- und Kronenethereinheit über den Raum.

Strukturell ähnliche Wirtverbindungen, wie 15K5A-Br, 15K5A-O und 2-15K5A wurden zur Ursachenklärung in die Untersuchungen einbezogen. Als einziges zeigt 15K5A-Br ähnliches Verhalten der 15K5A in wässriger Lösung. Die Fluoreszenzintensität dieser Verbindung ist zunächst deutlich geringer, was auf den so genannten Schweratomeffekt zurückgeführt werden kann. Jedoch werden ebenso spektrale Änderungen hinsichtlich Bandenlage und -form über die Zeit beobachtet. Dabei ist der Zeitraum der hypsochromen Verschiebung der Wellenlänge wesentlich verkürzt. Ein stabiler Zustand wird aber auch erst nach 24 h erhalten. Es ist anzunehmen, dass durch die Ankopplung des Broms am chromophoren System des Wirtmoleküls der Ladungsschwerpunkt des gesamten Moleküls in Richtung Anthraceneinheit verschoben wurde. Dadurch würde die Möglichkeit der Lageänderung der Anthraceneinheit zur Carbonyl- und im weiteren zur Kronenethereinheit und damit der verdrehte Zustand begünstigt, was zu einer vollständigen Ladungstrennung und damit zur anthracenartigen Fluoreszenz führt. Die Ursache der langen Zeitkonstante ist dadurch jedoch nicht begründet.

Bei der Wirtverbindung 15K5A-O wurde gezeigt, dass in wässriger Lösung keine spektralen Änderungen mit der Zeit zu beobachten sind. Einziger Unterschied zum 15K5A besteht in der Anknüpfung eines offenen Kronenethers anstelle eines geschlossenen Kronenetherringes. Diesbezüglich ist vermutlich die Ringöffnung mit einer unterbrochenen Konjugation am Kronenether verbunden. Je nach elektronischer Struktur des Linkers wird der Kronenetherring in das Chromophorsystem des Anthracenkomplexes¹ einbezogen. Insofern könnten sich Änderungen der elektronischen Struktur am Kronenether direkt auf das Fluoreszenzverhalten des Anthracenkomplexes auswirken. Im vorliegenden Fall könnte die Ringöffnung zur Energieerhöhung des perpendicularen Zustandes führen und verhindert vermutlich die Ausbildung eines entkoppelten Systems bei Verdrehung. Zum anderen lassen NMR-Untersuchungen von 15K5A-O in Aceton darauf hinweisen, dass zusätzlich zur energetischen eine sterische Beeinflussung der Anthraceneinheit durch mindestens einen Teil des offenen Kronenethers vermutet werden kann. Damit würde die Beweglichkeit der Anthraceneinheit stark gehindert und eine Konformationsänderung stark gehemmt bzw. verhindert und somit nur ein Zustand stabilisiert.

Des Weiteren wurde die Wirtverbindung 2-15K5A, keine 9-substituierte Anthracenverbindung, in wässriger Lösung untersucht und dabei keine duale

¹Anthracen und Linker

Lumineszenz gefunden. In der Literatur konnte duale Lumineszenz allerdings auch für 2-substituierte Anthracene nachgewiesen werden [122].

Einen weiteren Ansatz zur Diskussion dieses enorm langsamen Prozesses von 15K5A bildet die mögliche Selbstorganisation der Wirtverbindung zu helikalen Strukturen. Es ist bekannt, dass Kronenether in der Lage sind, helikale Strukturen auszubilden [123, 124]. Die langen Zeitkonstanten könnten durchaus anhand solcher Vorgänge erklärt werden, wozu Untersuchungen noch ausstehen.

Zusammenfassend können wesentliche Änderungen im Fluoreszenzverhalten von 15K5A auf unterschiedliche Polaritäten der Lösungsmittel sowie des pH-Wertes zurückgeführt werden. Aufgrund des enormen Einflusses des Kronenethers auf das Fluoreszenzverhalten des chromophoren Systems in wässriger Umgebung, werden durch die Einlagerung von Analytsubstanzen in den Kronenether erhebliche Änderungen im Fluoreszenzverhalten erwartet. Die enorm langsame Transformation könnte in der Sensorik z.B. in einer Art molekularer Schalter Anwendung finden. Möglich erscheint auch, dass ein Gastmolekül durch seine Wechselwirkung mit dem Wirtmolekül die spektrale Umwandlung verhindern könnte oder zu einem gewissen Zeitpunkt abbricht. Die gezielte Steuerung dieses enorm langsamen Umwandlungsprozesses wäre also wünschenswert.

4.3 Calix[6]arene C6DA und deC6DA

Die Charakterisierung des Fluoreszenzverhaltens der Calix[6]aren-Wirtverbindungen, bezeichnet mit C6DA und deC6DA, in verschiedenen Umgebungen ist Inhalt dieses Abschnittes. Sie unterscheiden sich durch das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von tert-Butylgruppen am upper rim des Calixarens.

4.3.1 Grundspektren zur Absorption und Fluoreszenz

Da am lower rim der Calix[6]arene eine Dansylamideinheit als chromophores System gekoppelt vorlag, wurde ein Vergleich des Absorptions- und Fluoreszenzverhaltens in Lösung mit ungebundenem Dansylamid durchgeführt.

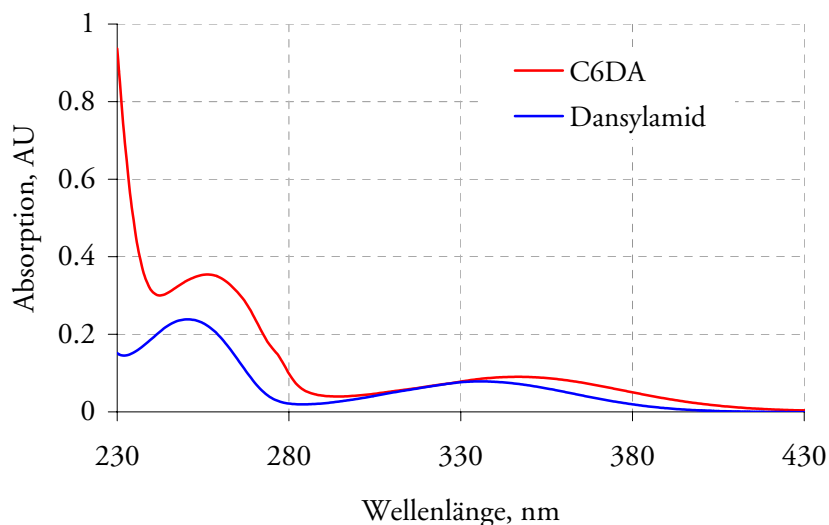


Abb. 4-19
Absorptionsspektren
in Acetonitril,
10 μM C6DA
10 μM Dansylamid

In Abb. 4-19 sind die in Acetonitril erhaltenen Absorptionsspektren von C6DA im Vergleich zum Dansylamid dargestellt. Die Absorptionsbande um 330 nm im Dansylamid ist im Absorptionsspektrum der Wirtverbindung um 10 nm bathochrom verschoben. Die Absorptionsintensität bei gleichen Konzentrationen ist nahezu identisch.

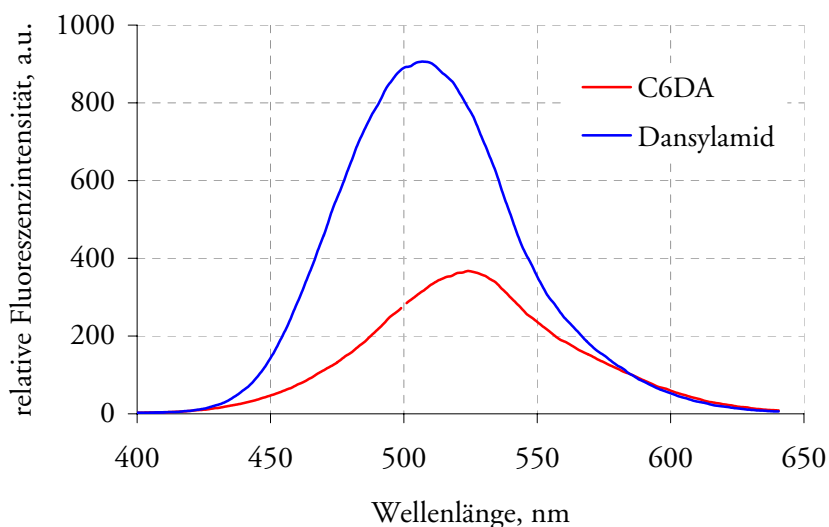


Abb. 4-20
Emissionsspektren in
Acetonitril,
10 μM C6DA
10 μM Dansylamid

Die Emissionsspektren der beiden zu vergleichenden Substanzen C6DA und Dansylamid in Acetonitril sind in Abb. 4-20 gezeigt. Die Anregungsspektren sind identisch dem Absorptionsverhalten. Im Emissionsspektrum der Wirtverbindung C6DA wird eine um 20 nm bathochrome Verschiebung der Bande gegenüber dem Dansylamid mit einem Emissionsmaximum um 507 nm beobachtet. Die Fluoreszenzintensität von C6DA ist im Vergleich zum ungebundenen Dansylamid bei gleicher Konzentration in Lösung um ca. 50 %

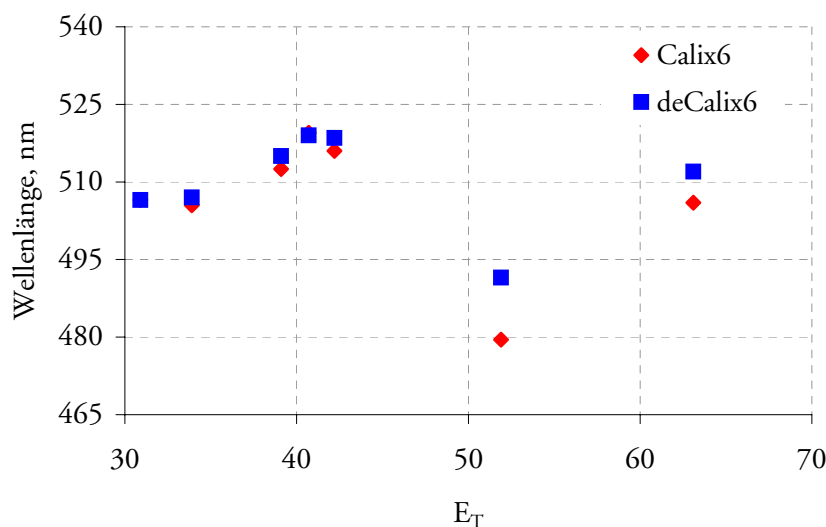
verringert. Das debutylierte Calix[6]aren, deC6DA, zeigt identisches Absorptions- und Fluoreszenzverhalten wie C6DA in Acetonitril.

4.3.2 Einfluss diverser Umgebungsbedingungen auf das Emissionsverhalten

Untersuchungen zum Emissionsverhalten in Abhängigkeit von der Polarität der Umgebung

Das Fluoreszenzverhalten von C6DA und deC6DA wurde analog der Charakterisierung von 15K5A in verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität untersucht. Änderungen im Emissionsspektrum hinsichtlich der Bandenform wurden dabei nicht beobachtet. Die Bandenlage variiert in Abhängigkeit von der Umgebung. In Abb. 4-21 ist der Polaritätsindex des Lösungsmittels nach Reichardt gegenüber der jeweiligen Wellenlänge maximaler Fluoreszenzintensität für beide Wirtverbindungen C6DA und deC6DA aufgetragen. Die Polaritätsindices der entsprechend verwendeten Lösungsmittel sind bereits in Tabelle 4-2 angegeben. Tendenziell zeigen beide Verbindungen das gleiche Fluoreszenzverhalten. In polarer Umgebung treten Differenzen im beobachteten Emissionsmaximum auf, die sich jedoch nicht auf den Gesamteindruck der polaritätsabhängigen Untersuchungen auswirken. Im Rahmen der verwendeten Lösungsmittel wird mit steigendem E_T -Wert im Bereich relativ unpolarer Umgebungen die bathochrome Verschiebung der Emissionsmaxima beobachtet. In polarer Umgebung wird dagegen eine im Vergleich zum Verhalten in unpolarer Umgebung stark hypsochrome Verschiebung in Ethanol erfasst. Aufgrund dieser experimentellen Befunde sind Schlussfolgerungen hinsichtlich einer positiven oder negativen Solvatochromie nicht eindeutig.

Abb. 4-21
Polaritätsabhängigkeit
(E_T -Wert) gegenüber
Wellenlängen-
maximum



Vergleichend wurde das Verhalten von Dansylamid in die Untersuchungen einbezogen. Dabei wurde hauptsächlich im interessierenden Bereich der Schwankungen im Fall von C6DA und deC6DA gearbeitet. Aus Abb. 4-22 wird ersichtlich, dass das Fluoreszenzverhalten von Dansylamid in Abhängigkeit vom E_T -Wert des Lösungsmittels eine bathochrome Verschiebung von unpolaren zu polaren Bedingungen zeigt. Positive Solvatochromie liegt vor.

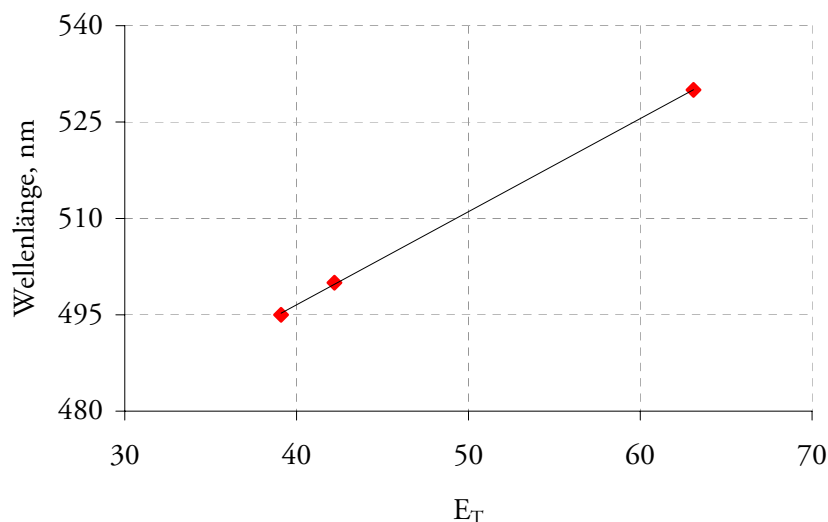


Abb. 4-22
Polaritätsabhängigkeit
von Dansylamid

Untersuchungen zum Emissionsverhalten in Abhängigkeit vom pH-Wert der Umgebung

Ausgehend vom Fluoreszenzverhalten in wässrigen Lösungen wurde der Einfluss des pH-Wertes der Umgebung von C6DA unter extrem basischen und sauren Bedingungen betrachtet.

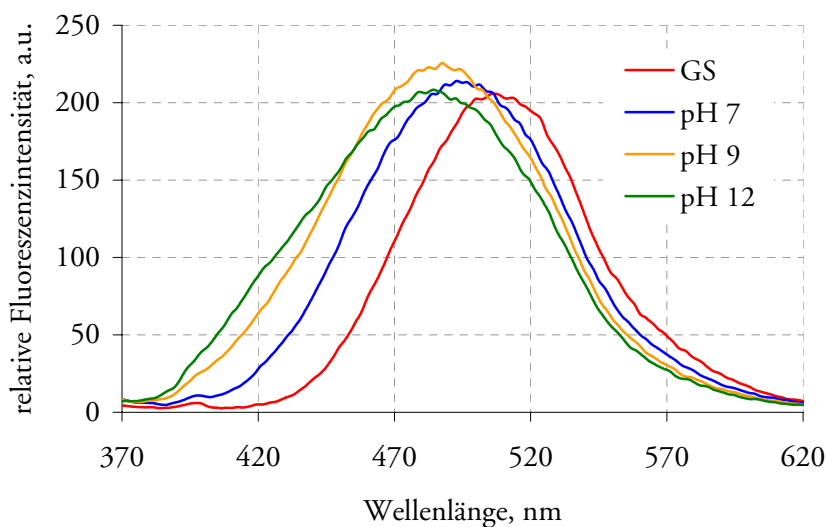
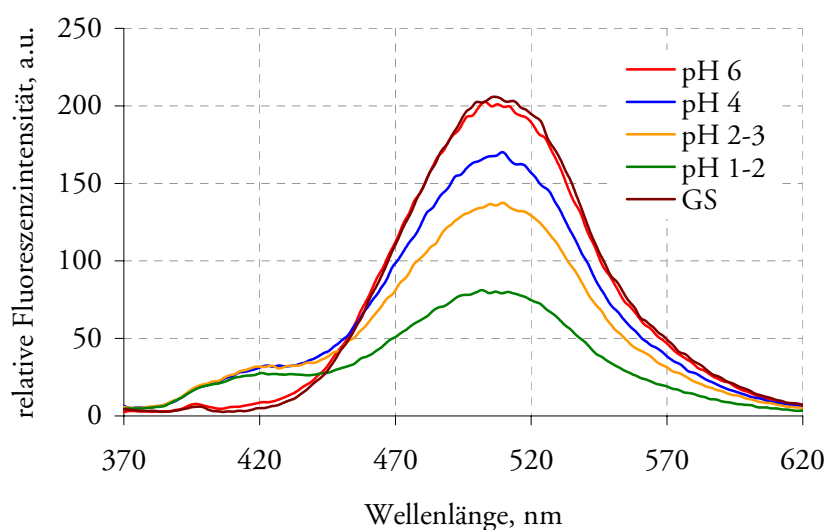


Abb. 4-23 a)
Verhalten von C6DA in
basischen
Umgebungen

Die Abb. 4-23 stellt die Ergebnisse einer 10 μM wässrigen C6DA-Lösung (pH 6) mit zunehmender a) Kaliumhydroxidkonzentration von 0,16 mM (pH 7), 0,6 mM (pH 9) und 1,3 mM (pH 12) sowie b) Salzsäurekonzentration von 0,48 mM (pH 4), 1,1 mM (pH 2-3) und 2,45 mM (pH 1-2) dar. Unter basischen Bedingungen wurden im Emissionsspektrum neben einer hypsochromen Verschiebung von 510 auf 485 nm deutlich verbreiterte Banden erhalten. Bei 420 nm deutet sich eine weitere Bande an. Die Intensitätsänderungen sind gegenüber den Intensitätsänderungen im sauren vernachlässigbar. In saurer Umgebung wurde ein signifikanter Intensitätsabfall sowie eine deutlich sichtbare Bande um 420 nm erhalten, die sich mit zunehmendem Säureanteil jedoch nicht änderte.

Abb. 4-23 b)
Verhalten von C6DA in
sauren Umgebungen



Zum Vergleich der pH-Abhängigkeit von C6DA wurden die Experimente simultan mit einer 10 μM wässrigen Dansylamid-Lösung (pH 6) durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität des Dansylamids in wässriger Lösung war um das 4-fache geringer als C6DA bei gleichen Konzentrationen. Sowohl unter basischen als auch sauren Bedingungen wurde neben der Bande um 530 nm eine zweite Bande um 420 nm beobachtet. Mit steigender Konzentration an Kaliumhydroxid wurde eine Zunahme der Fluoreszenzintensität um 420 nm, sowie eine geringfügige Abnahme der Intensität um 530 nm erhalten. In saurer Umgebung wurde eine starke Löschung, wie auch beim C6DA in der Bande um 530 nm beobachtet.

Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass die Ausbildung der Bande um 420 nm in den Spektren von C6DA auf den Einfluss des angekoppelten Dansylamids zurückgeführt werden kann.

4.3.3 NMR-spektroskopische Charakterisierung

Calix[6]arene können aufgrund ihrer Beweglichkeit in einer Vielzahl von Konformationen vorliegen, wie bereits in Abschnitt 2.3.2 gezeigt. Zur Strukturcharakterisierung des C6DA sind analog zum untersuchten Kronenether 15K5A verschiedene NMR-Untersuchungen durchgeführt worden. Aufgrund der Komplexität der Signalstrukturen des NMR-Spektrums waren keine eindeutigen Aussagen über eine vorhandene Struktur des Wirtmoleküls möglich. Es ist anzunehmen, dass das Wirtmolekül C6DA in einem Gemisch verschiedener alternierender Konformationen vorliegt.

5 Screening von Wechselwirkungen

Die Vielzahl von zur Verfügung gestandenen Wirtverbindung machten es notwendig, durch ein Überblicks-Screening das Verhalten im Beisein von Vertretern verschiedener Substanzfamilien zu untersuchen. Als Substanzgruppen wurden dabei die Terpene, Alkaloide und Aminosäuren betrachtet. Im folgenden Abschnitt sind dazu die wesentlichen Ergebnisse präsentiert.

5.1 Allgemeines

Den Untersuchungen zum Wirt-Gast-Verhalten muss vorangestellt werden, dass es sich bei den zur Verfügung stehenden Wirtverbindungen nicht um spezifisch für einen bestimmten Stoff bzw. eine Stoffklasse synthetisierte Verbindungen handelt. Prinzipiell existiert keine detaillierte Struktur-Eigenschafts-Korrelation zwischen der Wirtmolekülstruktur und Anlagerungseffektivitäten, auf deren Basis eine gezielte Synthese durchführbar wäre.

Ziel dieser Untersuchungen ist es deshalb, ausgewählte Substanzen auf ihre Wirt-Gast-Wechselwirkungen zu testen, um so einen Überblick über mögliche potentielle Analytsubstanzen bzw. Analytgruppen für die jeweiligen Wirtverbindungen zu erhalten. Im Folgenden werden die erhaltenen Ergebnisse mit ausgewählten Modellanalytsubstanzen von Terpenen, Aminosäuren und Alkaloiden vorgestellt und diskutiert.

Die Bestimmung der relativen Standardabweichung der Grundspektren ist Voraussetzung für Aussagen zur Signifikanz der Ergebnisse. Die RSD beträgt im Wesentlichen 5 %. Unter der Annahme des dreifachen Rauschens als Signifikanzlevel können demzufolge Signale größer 15 % als eindeutiges Signal betrachtet werden. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse stellt dabei einen weiteren wichtigen Punkt der Echtheit von Signalen dar.

5.2 Terpene

Untersucht wurde der Einfluss verschiedener acyclischer und monocyclischer Monoterpene sowie des monocyclischen Sesquiterpens α -Bisabolol.

In Tabelle 5-1 ist das Ergebnis eines Experimentes mit den Kronenetherverbindungen gezeigt. Die mittels Referenzmethode ermittelten prozentualen Abweichungen sind mit Werten von -16 % bis +18 % klein. Bezüglich der vorangestellten Signifikanz der Signale mit 15 % könnten z.B. Änderungen von 18 % im 2-15K5A in Anwesenheit von γ -Terpinen oder -16 % im 15K5A-O mit Limonen als eindeutige Signale betrachtet werden. Problematisch erscheint bisher jedoch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, die in wiederholten Messungen nicht erreicht werden konnte.

Durch die Wahl der Umgebungsbedingungen kann die Hohlraumgröße der Kronenether beeinflusst werden [52]. Diesbezüglich wurden die Untersuchungen mit Aceton, Ethanol und Cyclohexan als Lösungsmittel erweitert. Ein zufriedenstellendes Ergebnis konnte jedoch nicht erhalten werden.

Es zeigt sich, dass die im Wesentlichen eingesetzten 15-Krone-5-Verbindungen mit einem Innen-Ring-Durchmesser von 170 bis 220 pm [53] zur Einlagerung von Terpenen zu klein sind. Nimmt man die Größe eines Benzolringes als ungefähren Durchmesser eines aus einer Phenyleinheit bestehenden Terpens z.B. Limonen an, so ergibt sich eine Größe von etwa 280 pm. In diesem Fall ist eine direkte Einlagerung in den Ring sterisch ausgeschlossen. Jedoch besteht potentiell die Möglichkeit, ähnlich dem Kalium-Ion, zwischen z.B. zwei 15-Krone-5-Einheiten ein Molekül einzuschließen.

In fluoreszenzspektroskopischen Voruntersuchungen am Wirtmolekül 15K5A konnten verschiedene Fluoreszenzverhalten in Gegenwart von Natriumper-

chlorat gegenüber dem Einfluss von Kaliumperchlorat beobachtet werden [117]. Dabei werden die aus der Literatur für 15-Krone-5-Verbindungen bekannten Wechselwirkungen vermutet. Vorzugsweise bilden Kronenetherverbindungen mit Ionen Komplexe, wobei eine eindeutige Passfähigkeit zwischen Innenring-Durchmesser der Kronenether und dem Ionenradius gegeben ist.

Weiterhin besteht potentiell die Möglichkeit bei starker elektronischer Wechselwirkung zwischen Wirt und Analyt eine Anlagerung auf dem Ring zu detektieren. Insofern ist eine Anlagerung der Terpene oder Wechselwirkung mit mehreren Kronenetherverbindungen und damit zu einer Veränderung im Fluoreszenzverhalten führend nicht von vornherein auszuschließen. Die bisherigen Erkenntnisse lassen jedoch keine Wirt-Gast-Wechselwirkungen diesbezüglich vermuten. In weiterführenden Untersuchungen sollte die Erweiterung des Einschlussringes der Kronenethereinheit, z.B. 18-Krone-6 angestrebt werden, um die Möglichkeit einer sterischen Einlagerung zu verbessern. Es sind auch Überlegungen, ob ein Austausch der "harten" Sauerstoffatome durch Stickstoff- oder Schwefelatome zu besseren Ergebnissen führen einzubeziehen.

*Tabelle 5-1
Einfluss Terpene -
prozentuale Änderung
des Fluoreszenz-
verhaltens
Kronenether Konz.
10 μ M, Terpen Konz.
10 mM in Aceton,
ausgewertet jeweils im
Emissionsmaximum
um 450 nm*

	Eugenol	Nerol	Geraniol	4-Terpineol	Citronellol	Rosenoxiol
18K5A	7	11	6	4	1	1
15K5A	1	1	1	4	4	5
15K5A-Br	-2	11	7	-4	10	1
15K5A-O	9	5	3	4	-1	-1
2-15K5A-O2	-1	2	-1	-3	-4	-2
2-15K5A-O1	-1	7	-7	3	6	3
2-15K5A	0	-6	0	3	4	-1
	Linalool	γ -Terpinen	Limonen	α -Bisabolol	Citronellal	α -Terpineol
18K5A	5	-3	-7	-1	16	3
15K5A	2	1	1	1	2	2
15K5A-Br	8	-5	4	8	3	3
15K5A-O	4	-2	-16	-10	-15	16
2-15K5A-O2	9	15	2	3	5	7
2-15K5A-O1	14	-6	6	12	9	-7
2-15K5A	7	18	4	11	-4	-14

Hinsichtlich der zur Verfügung stehenden Hohlraumgröße bringen die Calixarenverbindungen im Vergleich zu den 15-Krone-5-Verbindungen bessere

Voraussetzungen einer sterischen Einlagerung mit. Beispielsweise können Calix[4]arene einen Hohlraum von etwa 400 pm am lower rim und etwa 700 pm am upper rim erreichen. Des Weiteren ist die Flexibilität hinsichtlich der Molekülform im Zuge der möglichen Synthesewege größer. Zum einen können durch geeignete Substitutionen am lower rim z.B. mit Propyl- und längeren Kohlenwasserstoffketten starre Formen vorgegeben werden. Zum anderen bieten Calixarene durch ihre Flexibilität die Möglichkeit ihre Konformation bereits bei Raumtemperaturen zu ändern.

Getestet wurde der Einfluss der Terpene auf das Fluoreszenzverhalten der bereitgestellten Calixarenverbindungen. Die Tabelle 5-2 gibt einen Einblick in die erhaltenen Ergebnisse ausgewählter Wirtverbindungen auf Basis der Calixarene in Anwesenheit von Terpenen. Die erhaltenen Daten liegen unterhalb der angestrebten Signifikanzgrenze von 15 %. Deshalb wurde auf die Darstellung der anderen Verbindungen verzichtet. Ausgewertet wurden die Spektren um 520 nm. Die Ergebnisse konnten in Wiederholungsmessungen jedoch ebenso wie im Fall der Kronenether nicht eindeutig reproduziert werden. Eine Tendenz der positiven bzw. negativen Änderung lässt sich bezüglich struktureller Eigenschaften der Terpene aus den bisherigen Erkenntnissen nicht ableiten.

Tabelle 5-2
Einfluss von Terpenen
auf ausgewählte
Calixarene

	α -Terpineol	Citronellol	α -Bisabolol	Limonen
PSt2	3	3	-4	-5
P45-1	4	-3	1	3
P45-2	1	2	0	3
RBE4	3	-2	-1	1
MF2	0	4	-2	2
C6DA	-6	-7	-9	-8
deC6DA	-3	-6	-6	-5

In gleicher Weise wurden die Untersuchungen, wie bereits im Abschnitt Kronenether diskutiert, unter anderen Umgebungsbedingungen durchgeführt. Die experimentellen Befunde wiesen darauf hin, dass unter den eingestellten Bedingungen in Anwesenheit verschiedener Terpene keine signifikanten fluoreszenzspektroskopisch detektierbaren Änderungen zu beobachten sind. Möglicherweise sind die untersuchten Wirtverbindungen in ihrer Konformation, insbesondere die Calix[4]arene durch ihre Komposition bereits zu starr. Die Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen könnte ebenfalls zu einem stabilen Zustand führen, so dass die Bindungskapazitäten abgesättigt sind. Potentiell kann zum momentanen Stand auch nicht ausgeschlossen werden, dass bereits durch die Synthese Lösungsmittelmoleküle fest eingelagert sind, dessen Wechselwirkungen wesentlich stärker ausgeprägt sind und somit durch die zu analysierenden Terpene nicht verdrängt werden können.

5.3 Alkaloide

Ein weiteres interessantes Anwendungsfeld stellen die Untersuchungen mit ausgewählten Vertretern der Alkaloide, insbesondere der Tropan-Alkaloide dar. Atropin wurde im Screening als Modellsubstanz eingesetzt. Getestet wurde das Fluoreszenzverhalten aller Calixarenverbindungen sowie ausgewählter Kronenetherverbindungen 15K5A, 15K5A-O und 2-15K5A.

Nach umfangreichen Untersuchungen der Wirtverbindungen in Aceton und Acetonitril wurden signifikante Änderungen im Fluoreszenzverhalten von C6DA und deC6DA in Anwesenheit von Atropin beobachtet. In den anderen Kronenether- sowie Calixarenverbindungen konnten keine Änderungen im Fluoreszenzverhalten erfasst werden, so dass auf eine Darstellung verzichtet wird.

Die Wirtverbindungen C6DA und deC6DA zeigten identisches Verhalten hinsichtlich Atropin. Aus dem Vergleich der Emissionsspektren des Grundsignals von C6DA zum C6DA-Atropin-Signal (Abb. 5-1), betrachtet bei 465 nm, resultiert neben einer Intensitätserhöhung auf das etwa 20-fache eine hypsochrome Verschiebung des Emissionsmaximums von zuvor 525 nm auf 465 nm. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse konnte in mehreren Messungen erfolgreich gezeigt werden. Die Wechselwirkung von Atropin und C6DA sowie deC6DA wird im Abschnitt 6 detailliert betrachtet und diskutiert.

Des Weiteren wurden die Untersuchungen in wässriger Lösung und Chloroform durchgeführt. Der Einfluss von Atropin auf das Fluoreszenzverhalten der Wirtverbindungen konnte auch hier nicht nachgewiesen werden. In wässriger Lösung konnten die Änderungen von C6DA und deC6DA mit Atropin nicht erfasst werden, wo hingegen in Chloroform detektierbare Änderungen zu beobachten waren. Daran wird deutlich, dass das umgebende Lösungsmittel einen wesentlichen Einfluss auf Wirt-Gast-Interaktionen ausübt.

Parallel wurden Untersuchungen mit den Purin-Basen Koffein, Theophyllin sowie Theobromin durchgeführt. Diese zeigten jedoch keinen Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten der untersuchten Wirtverbindungen.

Mögliche Ursachen der hier beobachteten Effekte könnten in der sterischen Begrenzung, insbesondere bei den Kronenetherverbindungen begründet liegen. Weiterhin wird vermutet, dass die vorhandenen Wechselwirkungsmöglichkeiten für Alkaloide nicht ausreichen, um eine fluoreszenzspektroskopische Detektion zu ermöglichen. Betrachtet man diesbezüglich die Strukturen von C6DA und deC6DA genauer, so sind als funktionelle Besonderheiten im Wesentlichen die fünf freien Carboxylgruppen und das Dansylamid als chromophore Einheit in dieser Komposition zu nennen. In anderen Calixarenverbindungen ist entweder Dansylchlorid als fluorophore Einheit angebunden und/oder es liegen keine freien Carboxylgruppen vor.

5.4 Aminosäuren

Ein Screening mit verschiedensten Vertretern der Aminosäuren, wie Glycin, Glutaminsäure, Cystein, Arginin und Tryptophan als proteinogene Ami-

nosäuren wurde durchgeführt. Die Substanzen lagen in Wasser gelöst vor. Zur Vermeidung von Lösungsmittelleffekten wurden die Untersuchungen zunächst in wässrigen Lösungen der Wirtverbindungen durchgeführt. Die ermittelten Änderungen im Fluoreszenzverhalten der Wirtverbindungen sind klein und liegen im Wesentlichen um +6 %. Hinsichtlich der vorangestellten Signifikanz konnten in wässriger Lösung somit keine eindeutigen Signale erhalten werden. Die Untersuchungen wurden demzufolge auch in Acetonitril durchgeführt, um mögliche Einflüsse des Wassers, wie im Fall von Atropin beobachtet, ausschließen zu können. Die wässrigen Lösungen der Aminosäuren wurden jedoch weiterhin eingesetzt. Der durch die Aminosäuren zugegebene Wasseranteil liegt in der zu messenden Probe im Wesentlichen im Verhältnis 1 : 120 Wasser : Acetonitril vor und wird durch die Referenzmessung kompensiert. Die Wirtverbindungen liegen in Acetonitril vor. In der zu vermessenden Probe sind etwa 160 μM Aminosäure vorhanden. Höhere Konzentrationen an Aminosäure konnten nicht in die Auswertung einbezogen werden, da aufgetretene Trübungserscheinungen das Messergebnis wesentlich beeinflussten.

Die experimentellen Befunde zeigten, dass in Anwesenheit von Arginin und Tryptophan Änderungen detektiert werden konnten. Dabei muss die optische Aktivität des Tryptophan selbst mit einem Emissionsmaximum um 400 nm berücksichtigt werden. Die Überlagerung zweier Spektren erfordert eine andere Auswertung, da zur Referenzmethode eine getrennte Betrachtung der Einzelbanden notwendig ist. Vereinfacht wurde mittels Differenzbildung eines unter gleichen Bedingungen aufgenommenen Tryptophan-Spektrums vom Wirtmolekül-Tryptophan-Spektrum eine erste Auswertung über signifikante Änderungen ermöglicht. Die beobachteten Änderungen (Tabelle 5-3) sind jedoch für Tryptophan unter den eingestellten Bedingungen nicht signifikant, so dass hierfür keine weiteren Untersuchungen durchgeführt wurden.

Aus Tabelle 5-3 geht weiterhin hervor, dass Signaländerungen im Wesentlichen in Calixarenverbindungen detektiert werden können. Änderungen von 54 % in Referenz zum Grundsignal wurden im Fluoreszenzverhalten von C6DA durch Arginin ausgelöst. Die Auswertung erfolgte jeweils im Emissionsmaximum der Fluoreszenzbande.

Tabelle 5-3
Einfluss
von Tryptophan und
Arginin auf die
Emission von
Wirtverbindungen
(Angabe der
prozentualen
Änderung des
Fluoreszenzverhaltens
+ Erhöhung
- Löschung)

Wirtverbin- dung	Tryptophan	Arginin	Auswertewellen- länge jeweils bei $\lambda_{\text{EM}}(\text{max})$, nm
15K5A	0	0	460
2-15K5A	-9	0	454
RBE	-4	-14	490
P64	2	-7	453
P45-1	0	-4	528
MF2	-1	0	530
PSt2	0	0	530
C6DA	13	54	525

Betrachtet man die Emissionsspektren von C6DA ohne und mit Arginin (Abb. 5-1) so wird neben einer Intensitätserhöhung auf das 10-fache bei der Wellenlänge von 470 nm, eine hypsochrome Wellenlängenverschiebung um 60 nm beobachtet. Das spektrale Verhalten ähnelt den beobachteten Änderungen von C6DA mit Atropin.

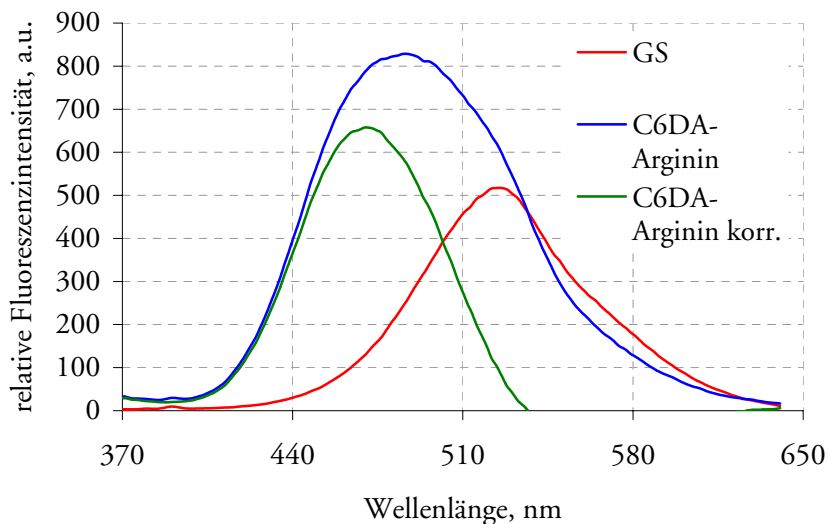


Abb. 5-1
Einfluss von Arginin
auf die Emission von
C6DA

Die weiteren untersuchten Wirtverbindungen zeigen zum Teil geringe bis keine Änderungen, die auf Intensitätsänderungen, nicht aber auf spektrale Änderungen der Bandenlage beruhen. Handelt es sich nur um Intensitätsänderungen sind die Ergebnisse wesentlich durch die Schwankungsbreite des Grundsignals beeinflusst.

Mögliche Ursachen, warum eine fluoreszenzspektroskopische Detektion der Wechselwirkungen nicht möglich scheint wurden bereits in den Abschnitten Terpene und Alkaloide andiskutiert.

5.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend wird festgestellt, dass die zur Verfügung gestellten Kronenether als auch die Calixarene in Gegenwart der ausgewählten Analytsubstanzen mit Ausnahme von C6DA und deC6DA ihr Fluoreszenzverhalten nicht in signifikantem Maße ändern.

Mögliche Ursachen können auf der Komposition der Wirtverbindungen beruhen. Dies liegt zum einen vermutlich in der Größe und Form der Wirtverbindungen, so dass eine Einlagerung in den zur Verfügung stehenden Einschlussringen bzw. Hohlräumen nicht gewährleistet werden kann. Weiterhin wird vermutet, dass die Abwesenheit passender Bindungsstellen eine Wechselwirkung verhindert. Auch können intramolekulare Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen im Wirtsystem selbst zur Absättigung der Bindungskapazitäten führen.

Die bisher zur Verfügung stehenden Methoden der theoretischen Chemie z.B. das Molecular Modelling ermöglichen noch keine ausreichenden Vorhersagen von Wirtstrukturen zu einem beliebigen Gastmolekül. Aufbauend auf grundlegende theoretische Überlegungen besteht somit die Notwendigkeit Wirt-Gast-Wechselwirkungen experimentell zu bestimmen.

Die Funktionsweise des im Array angestrebten Prinzips des fluoreszenzspektroskopischen Nachweises von Wirt-Gast-Wechselwirkung kann am Beispiel der makrozyklischen Wirtverbindungen C6DA und deC6DA mit Atropin und Arginin gezeigt werden. Anhand von Atropin werden die Interaktionen mit C6DA im folgenden Abschnitt genauer betrachtet und diskutiert.

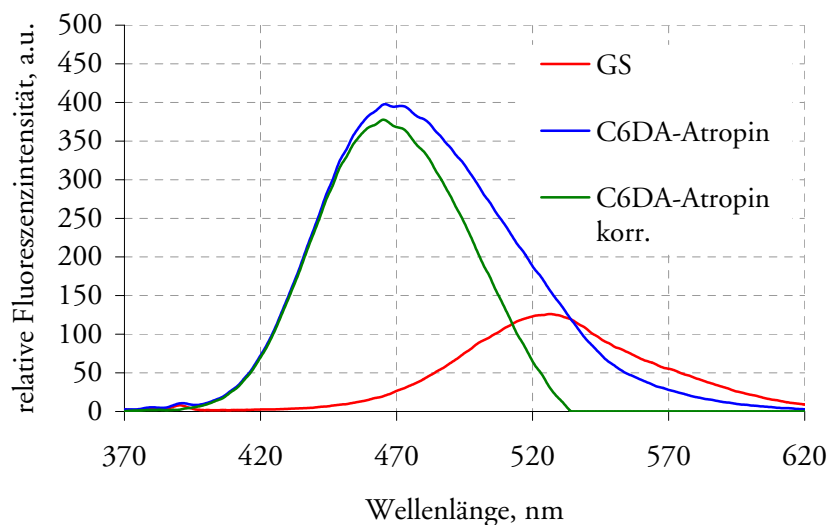
6 Wirt-Gast-Verhalten von C6DA und deC6DA

Die erhaltenen Fluoreszenzänderungen der Wirtverbindungen C6DA und deC6DA in Gegenwart diverser Analytsubstanzen sollen genauer charakterisiert werden. Insbesondere werden die Untersuchungen ausgehend von den signifikanten Änderungen im Fluoreszenzverhalten in Anwesenheit des Tropan-Alkaloids Atropin betrachtet.

6.1 Atropin

Basierend auf den Ergebnissen des Screenings nach potentiellen Analytsubstanzen wird das Fluoreszenzverhalten von C6DA und deC6DA mit Atropin zunächst in Acetonitril genauer betrachtet und charakterisiert. Aufgrund des festgestellten identischen Verhaltens der beiden Wirtmoleküle auch bezüglich der Wechselwirkung mit Atropin wird im Folgenden C6DA für beide Calix[6]arene verwendet. Das Wirtmolekül liegt in einer Konzentration von $3,2\ \mu\text{M}$ und Atropin, als Analyt mit einer Konzentration von $250\ \mu\text{M}$ in Acetonitril vor. Die Anregung zur Emission wird bei einer Wellenlänge von $350\ \text{nm}$ erreicht. Während im Emissionsspektrum des Referenzsignals, C6DA in Acetonitril, ein Emissionsmaximum um $525\ \text{nm}$ zu beobachten ist, führt die Zuführung von Atropin zu drastischen Änderungen im Fluoreszenzverhalten. Eine hypsochrome Verschiebung um $60\ \text{nm}$ zu einem Fluoreszenzmaximum um $465\ \text{nm}$ verbunden mit einem starken Intensitätsanstieg werden erhalten. In Abb. 6-1 sind zum einen die Spektren von C6DA gegenüber dem nicht korrigierten C6DA mit Atropin und dem bezüglich des Grundsignals korrigierten C6DA mit Atropin dargestellt. Das korrigierte Spektrum wurde durch Differenzbildung zum Ausgangsspektrum der fluoreszierenden Verbindung erhalten.

Abb. 6-1
Fluoreszenzverhalten
C6DA und Atropin



Quantifiziert man den Intensitätsanstieg im Emissionsmaximum des C6DA-Atropin-Spektrums bei $465\ \text{nm}$ so wird eine Verstärkung der Intensität um das 20-fache bezogen auf das Referenzsignal erfasst. Atropin lag in diesem Fall im etwa 80-fachen Überschuss bezüglich der Wirtverbindung vor.

Einfluss der Konzentration von Atropin auf das Fluoreszenzverhalten

Ausgehend von den signifikanten Änderungen im Fluoreszenzverhalten von C6DA wurde in weiterführenden Experimenten die Abhängigkeit der Wechselwirkung von der Atropinkonzentration untersucht. Es konnten Änderungen in der Fluoreszenzintensität bis zu einem Punkt der Sättigung beobachtet werden. Die Sättigung wird in etwa bei einem 200-fachen Überschuss an Atropin gegenüber C6DA erreicht. Die Ergebnisse wurden reproduzierbar wiederholt. Die prinzipielle Abhängigkeit ist in Abb. 6-2 durch Auftragen der bezüglich des Grundsignals korrigierten Fluoreszenzintensität¹ gegenüber der Konzentration an Atropin verdeutlicht.

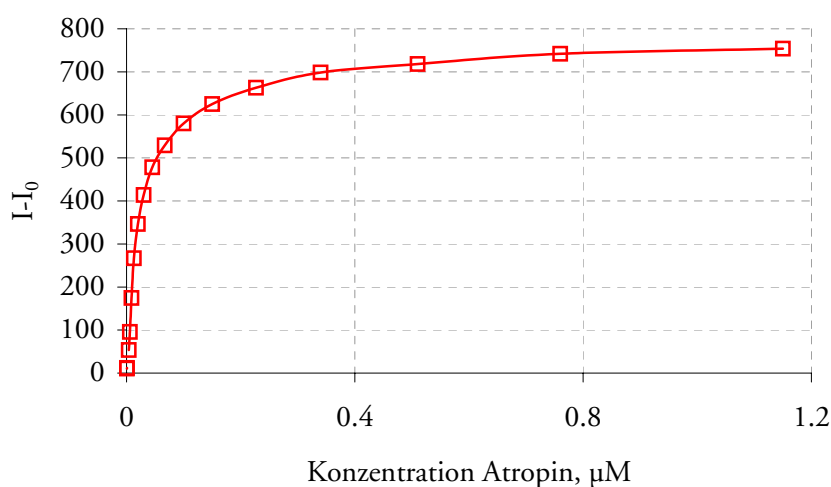
¹ $I-I_0$


Abb. 6-2
Fluoreszenzverhalten
von C6DA in
Abhängigkeit von der
Atropinkonzentration

Die kleinste noch untersuchte Konzentration an Atropin betrug 500 nM. In diesem Fall wurde, bezogen auf das Grundsignal, eine Intensitätserhöhung um 26 % beobachtet. Die Grundschwankung von C6DA liegt um 5 %. Unter der Voraussetzung, dass ein Signal größer der dreifachen RSD als signifikant betrachtet wird, ist die prozentuale Änderung von 26 % ein eindeutiges Signal. Eine Konzentration von 500 nM Atropin in Umgebung von C6DA kann nachgewiesen werden.

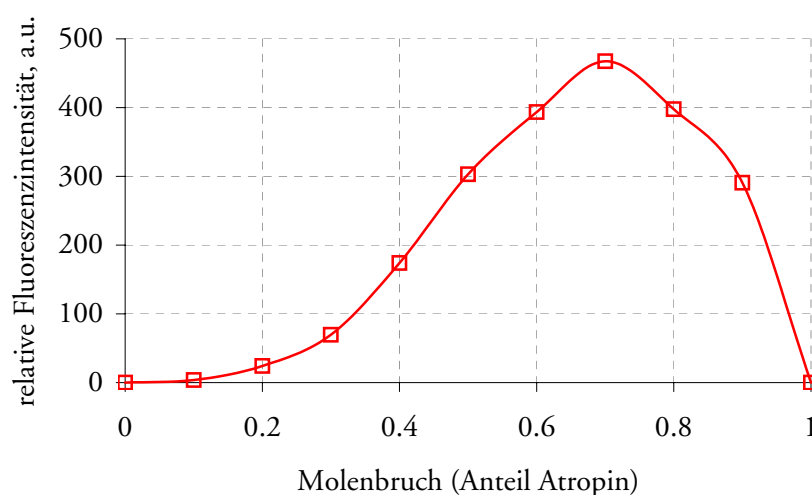
Bestimmung des stöchiometrischen Verhältnisses von C6DA und Atropin

Im weiteren bestand das Ziel eine Aussage zur stöchiometrischen Zusammensetzung von Atropin und C6DA zu erhalten. Der Sättigungseffekt von C6DA mit einem großen Überschuss an Atropin weist bereits darauf hin, dass das Vorliegen eines 1 : 1 Komplexes zwischen Analyt- und Wirtmolekül ausgeschlossen werden kann. Die Zusammensetzung des stöchiometrischen Verhältnisses von Atropin und C6DA wurde zunächst mit Hilfe eines Variationsplots betrachtet. Die Gesamtkonzentration an Atropin und Wirtmolekül wurde

dabei konstant gehalten (siehe auch Abschnitt 3.2.4). Die Untersuchungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

In Abb. 6-3 ist das Ergebnis einer 10 μM Lösung von C6DA und Atropin dargestellt. Das Maximum der erhaltenen Kurve liegt in etwa bei 0,7. Die Durchführung mehrerer Messungen zeigte jedoch, dass das Maximum zwischen 0,65 und 0,75 schwankt. Eine stöchiometrische Zusammensetzung von 0,25 : 0,75 Wirt : Gast würde einer 1 : 3 Komplexierung entsprechen. Um genaue Aussagen treffen zu können, müssen die einzelnen Punktabstände erheblich verkleinert werden. Zum anderen würde im Fall einer schwachen Komplexbildung diese Methode nur ungenaue Aussagen liefern und nur mit aufwendigen Methoden ein genaues Ergebnis erzielt werden [115]. In jedem Fall konnte bestätigt werden, dass keine 1 : 1 Komplexierung vorliegt. Aus den ersten Ergebnissen wird vermutet, dass es sich um eine Interaktion von mindestens 3 Atropinmolekülen an einem Molekül C6DA handelt.

Abb. 6-3
Job-Plot von
Verhältnissen von
C6DA und Atropin



NMR-Untersuchungen

NMR-spektroskopische Untersuchungen wurden zur Klärung der Komplexbildung einbezogen. Ein Vergleich der NMR-Spektren von C6DA und Atropin und dem C6DA-Atropin-Gemisch zeigt, dass im Gemisch keine Signale des freien Atropins zu finden sind. Atropin lag in einem 3-fachen Überschuss zum Wirtmolekül vor. Die Untersuchungen wurden in deuteriertem Acetonitril durchgeführt. Die genaue räumliche Anbindung von Atropin und C6DA konnte aufgrund der Vielzahl an Signalen im NMR-Spektrum nicht zugeordnet werden. Demzufolge wurde keine Bindungskonstante ermittelt. Die Vermutung der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen zur stöchiometrischen Zusammensetzung konnten anhand dieser Ergebnisse gestützt werden.

Parallel zu den NMR-Untersuchungen wurde das Fluoreszenzverhalten des C6DA in Anwesenheit von Atropin in deuteriertem Acetonitril untersucht.

Die spektralen Änderungen von C6DA durch Atropin hervorgerufen konnten in deuteriertem Acetonitril in gleicher Weise wie in Acetonitril beobachtet werden.

Einfluss Lösungsmittelumgebung

Der Einfluss von Acetonitril auf die Wirt-Gast-Wechselwirkung von Atropin und C6DA wurde durch vergleichende Untersuchungen in Chloroform und wässriger Lösung überprüft.

Das Fluoreszenzverhalten von 10 μM C6DA in Chloroform unterscheidet sich in seinem Emissionsmaximum durch eine hypsochrome Verschiebung um 15 nm im Vergleich zu Untersuchungen in Acetonitril. Die Zugabe von Atropin führt ebenfalls zu detektierbaren spektralen Veränderungen hinsichtlich Bandenlage und -form, die jedoch im Vergleich zum "Atropineffekt" in Acetonitril weniger stark ausgeprägt sind. Dies resultiert aus der stärkeren Überlagerung der Emissionsspektren des Grundsignals ohne Atropin und mit Atropin. In Abb. 6-4 sind die Emissionsspektren von C6DA in Chloroform, mit Atropin korrigiert bezüglich des Grundsignals und nicht korrigiert bezüglich des Grundsignals dargestellt.

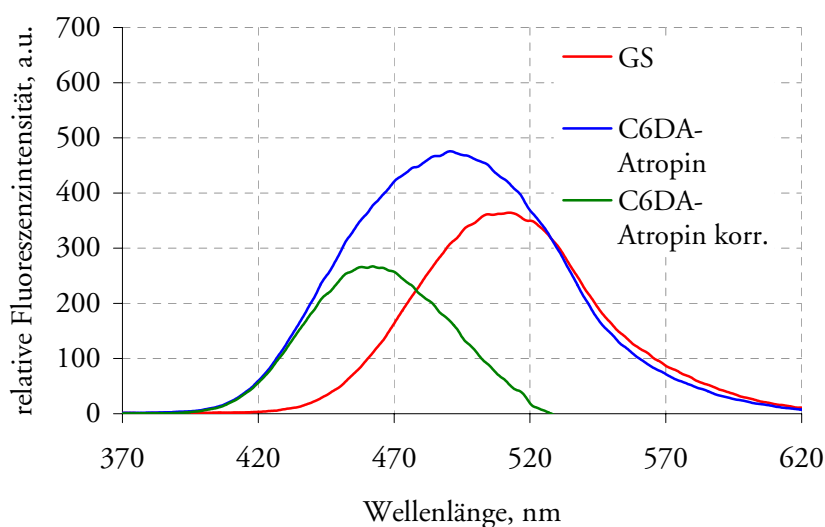
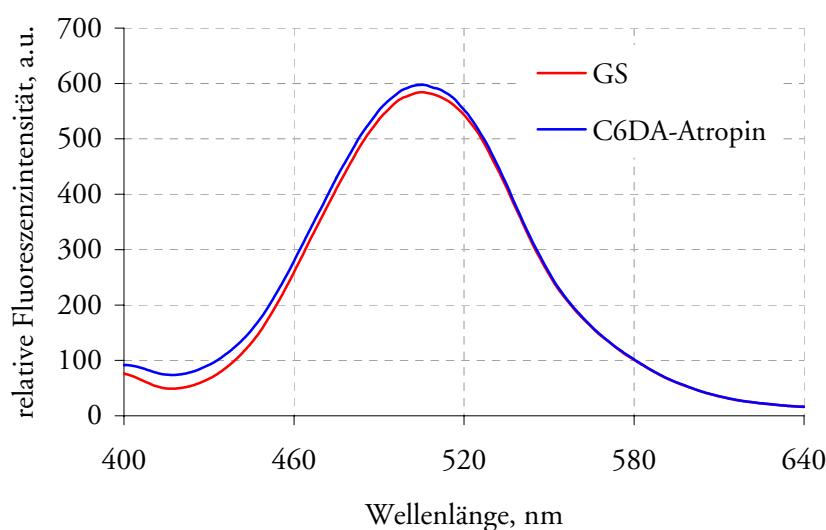


Abb. 6-4
Fluoreszenzverhalten
von C6DA mit Atropin
in Chloroform

Im Vergleich zu den Untersuchungen in Acetonitril wurde in Umgebung von Chloroform nach Korrektur bezüglich des Grundsignals im Emissionsspektrum von C6DA mit Atropin ebenfalls das Maximum bei einer Wellenlänge um 465 nm beobachtet. Betrachtet man die Intensitäten der C6DA-Atropin-Spektren in Acetonitril und Chloroform bei 465 nm im Vergleich zum Grundsignal, so wird unter gleichen Bedingungen in Acetonitril eine etwa 17-fache und in Chloroform eine etwa 2-fache Verstärkung der Fluoreszenzintensität erfasst. Die Konzentration an Atropin im System betrug in beiden Fällen 550 μM .

Gegenüber den bisherigen Betrachtungen des Fluoreszenzverhaltens von C6DA in Chloroform und Acetonitril mit Atropin wurden diese durch Untersuchungen in wässriger Lösung erweitert. In wässriger Lösung sind nahezu keine spektralen Veränderungen detektierbar. In Abb. 6-5 sind die Emissionsspektren des Referenzsignals sowie des C6DA-Atropin-Signals in wässriger Lösung dargestellt. Atropin liegt im 10-fachen Überschuss vor. Eine geringfügige Verstärkung der linken Schulter wird im Emissionsspektrum beobachtet. Die prozentuale Änderung bezüglich des Referenzsignals beträgt etwa 6 % bei der Wellenlänge von 465 nm. Bezüglich der Signifikanz kann das Ergebnis nicht als eindeutiges Signal angesehen werden. Somit ist eine Wechselwirkung von Analyt- und Wirtmolekül in wässriger Umgebung nicht nachweisbar.

Abb. 6-5
Fluoreszenzverhalten
von C6DA mit Atropin
in Wasser



6.2 Selektivität

In Hinblick auf den Einsatz von C6DA als Sondenmolekül in Mikroarrays wurde die Selektivität der Interaktion von C6DA mit Atropin betrachtet. Im Speziellen wurde das Fluoreszenzverhalten von C6DA mit den strukturell ähnlichen Alkaloiden Hyoscyamin und Scopolamin überprüft. Des Weiteren wurden Alkaloid-Derivate von Scopolamin und Kokain in die Untersuchungen einbezogen.

6.2.1 Hyoscyamin

Hyoscyamin ist ein Racemat des Atropin. Im Gegensatz zum Atropin, bei dem der Ester aus Tropan-3a-ol und der racemischen (R,S)-Tropasäure gebildet wird, wird in Hyoscyamin die (S)-(-)-Tropasäure mit Tropan-3a-ol verestert [103].

Der Einfluss von Hyoscyamin auf das Fluoreszenzverhalten von C6DA in Acetonitril wurde im Vergleich zum Atropin überprüft. Dabei lagen die Analytsubstanzen mit Konzentrationen von 2,7 mM und C6DA in einer

Konzentration von 10 μM in Acetonitril vor. Die Abb. 6-6 zeigt das Referenzspektrum im Vergleich zu den Emissionsspektren von C6DA-Atropin und C6DA-Hyoscyamin. Die Spektren der Substanzgemische sind bezüglich des Referenzsignals nicht korrigiert. Betrachtet man die Emissionsspektren von C6DA mit Atropin gegenüber Hyoscyamin, so sind die beobachteten Effekte gleich, sie zeigen identisches Verhalten.

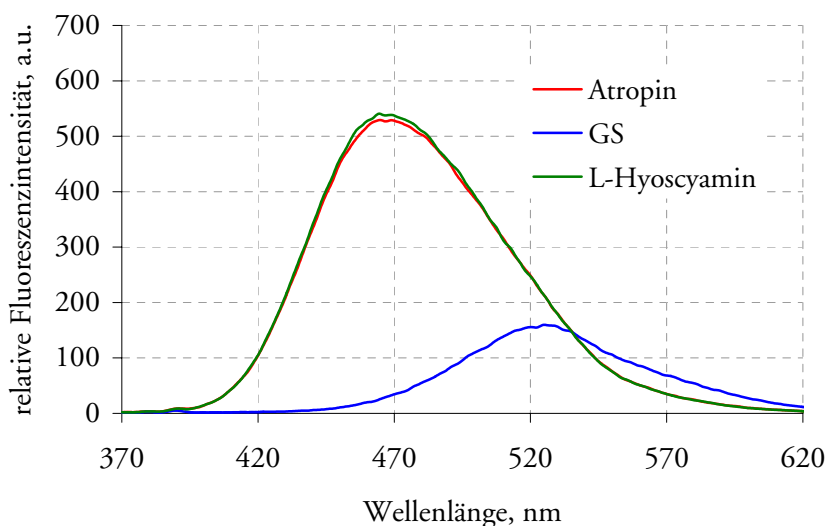


Abb. 6-6
Vergleich des
Einflusses von
Hyoscyamin und
Atropin auf C6DA

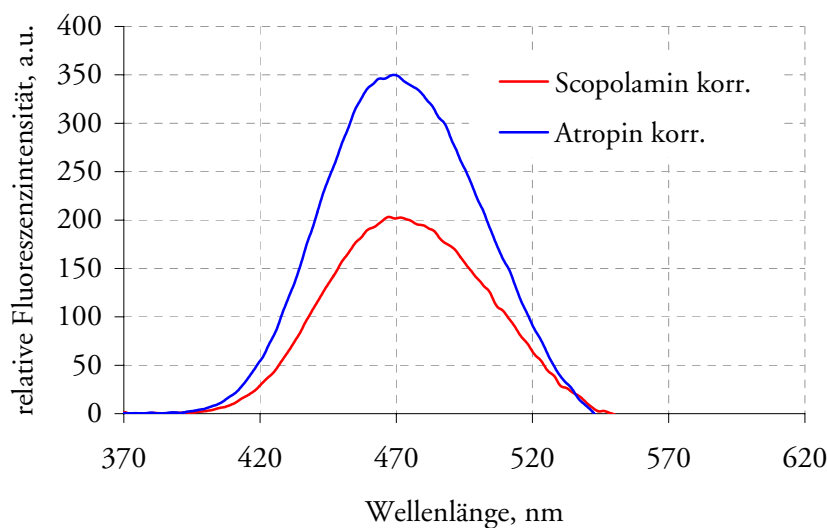
6.2.2 Scopolamin

Strukturell unterscheidet sich Scopolamin vom Atropin nur durch Erweiterung des Tropan-Systems durch Anknüpfung eines Oxiran-Ringes in der 6,7-Stellung [103].

Scopolamin ist in reiner Form nicht stabil und kommerziell nur als Derivat wie z.B. Scopolaminhydrochlorid oder als Scopolaminhydrobromid erhältlich. Mit Hilfe des Anionenaustauscherharzes IRA-400 (OH) wurden die Bromid-Ionen aus der Verbindung entfernt und durch Hydroxid-Ionen ersetzt (siehe auch Abschnitt 3.2.5). Es wird eine wässrige basische Scopolaminhydroxid-Lösung mit einem pH-Wert von etwa 10 erhalten. Die Probe wurde nicht weiter bearbeitet, sondern in dieser Form als Analytsubstanz eingesetzt. Die genaue Konzentration dieser Lösung ist nicht bekannt. Im Absorptionsspektrum der basischen Scopolamin-Lösung wurde eine Bande um 257 nm mit einer Extinktion von 0,08 gefunden. Unter der Annahme gleicher Extinktionskoeffizienten von Scopolamin und Atropin, wurde aus den Absorptionsspektren eine Aussage zur Konzentration abgeleitet. Atropin wurde als Referenz mit einer Konzentration von 10 mM in Wasser untersucht. Hier wurde im Absorptionsspektrum bei der Bande um 257 nm eine Extinktion von 0,065 gefunden. Ausgehend von nahezu gleichen Extinktionen im Absorptionsmaximum um 257 nm wurde für die Scopolamin-Lösung eine Konzentration von 10 mM angenommen.

Das Fluoreszenzverhalten von C6DA in Acetonitril in Gegenwart von Scopolamin und Atropin in wässriger Lösung ist in Abb. 6-7 dargestellt. Die Spektren wurden bezüglich des Referenzsignals korrigiert. Atropin und Scopolamin wurden in Konzentrationen um 60 μM untersucht. Die Konzentration an C6DA in Lösung beträgt 10 μM . Das spektrale Verhalten der Wirtverbindungen wird nach Zugabe von Scopolamin in ähnlicher Weise wie Atropin beeinflusst. Das Emissionsmaximum befindet sich um 465 nm. Unter Annahme gleicher Konzentrationen resultiert eine geringere Intensitätserhöhung.

Abb. 6-7
Vergleich des
Fluoreszenz-
verhaltens von Atropin
und Scopolamin
 $\lambda_{\text{EX}} = 360 \text{ nm}$



Betrachtet man die Intensitätsänderungen im Emissionsmaximum der C6DA-Analyt-Bande im Vergleich zueinander, so ist die Fluoreszenzintensität in Gegenwart von Atropin (pH 6) um das 13-fache verstärkt hingegen in Umgebung der Scopolaminlösung (pH 10) eine 7-fache Verstärkung der Signalintensität bezüglich des Referenzsignals zu beobachten ist.

6.2.3 Säurederivate der Alkaloide Scopolamin und Kokain

Der Einfluss der Säurederivate der Alkaloide Scopolaminhydrochlorid und -hydrobromid sowie Kokainhydrochlorid auf das fluoreszenzspektroskopische Verhalten von C6DA ist Gegenstand dieses Abschnittes.

In gleicher Weise wie die Durchführung der Atropin-Untersuchungen wurde das Fluoreszenzverhalten in Gegenwart der Alkaloid-Derivate untersucht. Spektrale Veränderungen im Fluoreszenzverhalten von C6DA konnten dabei aber nicht beobachtet werden. Wesentliche Änderungen konnten jedoch nach Zugabe der Alkaloid-Derivate zu einer C6DA-Atropin-Lösung detektiert werden. Entgegen der, durch Atropin hervorgerufenen hypsochromen Verschiebung des Emissionsspektrums wurde eine rückläufige bathochrome Verschiebung sowie eine Intensitätsverringering rückläufig zum Referenzsignal C6DA erkennbar.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden hinsichtlich der Abhängigkeit von der in Lösung vorhandenen Konzentration an Atropin und Derivat überprüft. Es zeigte sich, dass bei Vorhandensein beider Substanzen in gleicher Konzentration annähernd das gleiche Fluoreszenzverhalten erhalten wird. Dabei spielt die Reihenfolge der Zugabe der Analytsubstanzen keine Rolle.

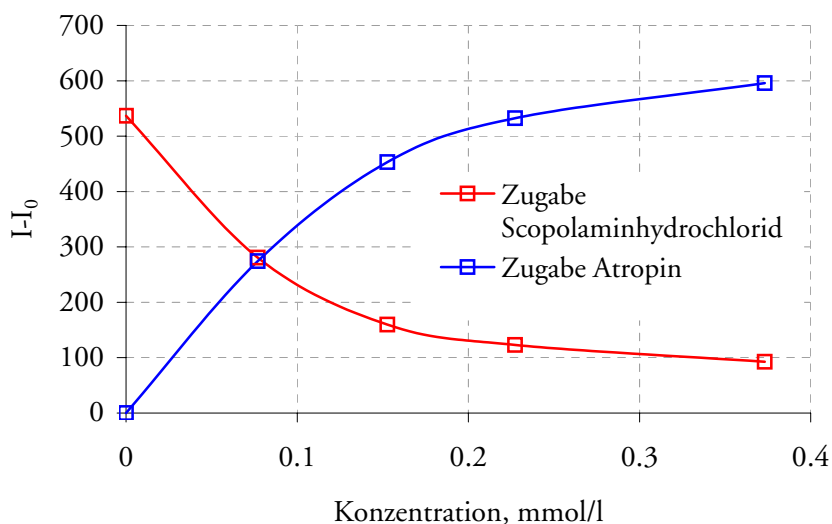


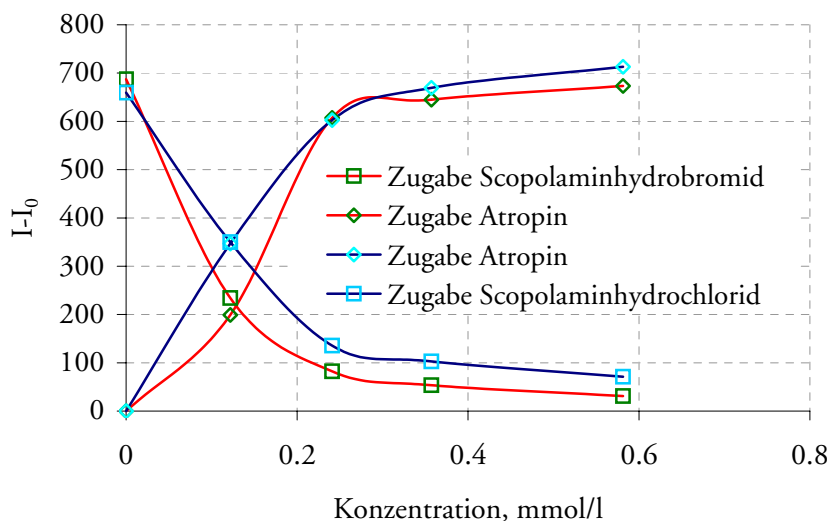
Abb. 6-8
Verhalten von
C6DA-Atropin und
Kokainhydrochlorid

In Abb. 6-8 ist dieses Verhalten am Beispiel von Kokainhydrochlorid gezeigt. Der Schnittpunkt der beiden Kurven entspricht gleicher Konzentration der beiden Analytsubstanzen in Lösung.

Liegt, wie in Abb. 6-8 dargestellt, Atropin mit einer Konzentration von 75 μM in C6DA-Lösung vor, so führt die Zugabe von Kokainhydrochlorid mit 75 μM in C6DA-Atropin-Lösung zu einer Löschung der Fluoreszenzintensität auf 300 Einheiten. Analog dazu wird in umgekehrter Reihenfolge ein Fluoreszenzintensitätsanstieg von in etwa 300 Einheiten durch Zugabe einer Atropin-Lösung zu einer Kokainhydrochloridlösung gleicher Konzentration festgestellt. Die Ergebnisse der Untersuchungen des Fluoreszenzverhaltens von C6DA mit Scopolaminhydrochlorid sind identisch denen mit Kokainhydrochlorid.

In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluss der Säurestärke des Derivates auf das Fluoreszenzverhalten getestet. In einem Vergleich von Scopolaminhydrochlorid und Scopolaminhydrobromid wurde das in Abb. 6-9 dargestellte Ergebnis erhalten. Die eingesetzten Konzentrationen von C6DA liegen bei 10 μM sowie die Anfangskonzentrationen der Analytsubstanzen bei 120 μM . Die Schnittpunkte der Kurven liegen in beiden Fällen im Punkt gleicher Konzentrationen an Analytsubstanzen in Lösung. Allerdings wird eine stärkere Löschung bzw. geringere Intensitätserhöhung durch Hydrobromidionen hervorgerufen. Betrachtet man die Intensität der Schnittpunkte so wird eine um den Faktor 1,6 stärkere Hemmung im Fall vom Scopolaminhydrobromid hervorgerufen.

Abb. 6-9
C6DA im Vergleich mit
Scopolaminhydro-
chlorid und Scopol-
aminhydrobromid



6.3 Querempfindlichkeit

Alkaloide besitzen mehr oder weniger stark ausgeprägten basischen Charakter. Aufgrund dessen besteht die Notwendigkeit, die Querempfindlichkeit des Fluoreszenzverhaltens von C6DA mit anderen Substanzen ähnlicher basischer Eigenschaften zu testen.

Ähnlich dem "Atropin-Effekt" wurden Änderungen im Fluoreszenzverhalten von C6DA bei der im Screening untersuchten Aminosäure Arginin gefunden. Arginin zählt zu den basischen Aminosäuren. Aufgrund der beschriebenen Trübungserscheinungen konnten die Untersuchungen nicht detaillierter betrachtet werden.

Des Weiteren stellen Vertreter der Amine sowie Kalium- und Ammoniumhydroxid potentielle Analytverbindungen zur Testung der Querempfindlichkeit dar. In Abb. 6-10 ist das Fluoreszenzverhalten von C6DA in Gegenwart der verschiedenen Basen Kalium- und Ammoniumhydroxid im Vergleich zum Atropin gezeigt. Die Analytsubstanzen wurden in Wasser gelöst in einer Konzentration von 64 μM eingesetzt. Die Wirtverbindung lag mit einer Konzentration von 3 μM in Acetonitril vor.

Die spektralen Veränderungen sind signifikant und ähnlich dem bereits beschriebenen "Atropin-Effekt". Die Fluoreszenzintensität von C6DA ist in Gegenwart von Kaliumhydroxid in etwa um das 1,5 fache intensiver als in Anwesenheit der Analytmoleküle Ammoniumhydroxid oder Atropin. Atropin ist in seinem Verhalten nahezu identisch dem Ammoniumhydroxid.

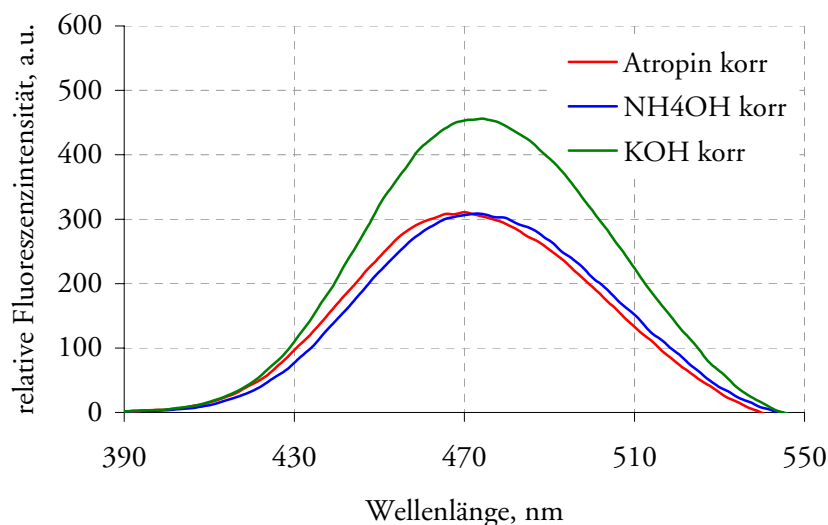


Abb. 6-10
Emission von C6DA in
Gegenwart
verschiedener Basen

Calixarene und Amine

Die Wechselwirkung organischer Amine mit Calixarenen ist bereits mehrfach aus der Literatur bekannt [52]. Inwiefern diese einen Einfluss auf das fluoreszenzspektroskopische Verhalten von C6DA ausüben, sollen Untersuchungen mit ausgewählten Aminen zeigen. Für diese Untersuchungen wurden die Calixarene C6DA/deC6DA in Acetonitril mit einer Konzentration von 10 μM eingesetzt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Amine in nahezu identischer Weise wie Atropin Änderungen im Fluoreszenzverhalten von C6DA und deC6DA hervorrufen. Dabei wurden die Amine wie auch das Atropin in einem vielfachen Überschuss zugegeben. In Tabelle 6-1 ist die Erhöhung der Fluoreszenzintensität von C6DA in Gegenwart einiger Amine und Atropin in Referenz zum Grundsignal bei 465 nm dargestellt. Diesbezüglich besteht eine Querempfindlichkeit von C6DA mit Aminen.

Analyt	Konzentration Analyt, mM	Faktor bezogen auf Referenz bei $\lambda = 465 \text{ nm}$
n-Propylamin	3.8	28.8
1,3-Diaminopropan	7.5	30.7
4-tert-Butylbenzylamin	1.8	29.6
Atropin	1.8	26.1

Tabelle 6-1
Vergleich Amine und
Atropin

6.4 Einfluss von Schweratomverbindungen

Neben dem Einfluss von Alkaloid-Säurederivaten auf das Fluoreszenzverhalten von C6DA, sollte das Verhalten in Gegenwart von Schweratomverbindungen mit Chlorid- oder Bromid-Ionen in ähnlicher Weise untersucht werden. Dazu wurden Substanzen, die typischerweise auch als Löserschubstanzen in der Fluoreszenzanalytik bekannt, sind eingesetzt. Insbesondere werden hier Ergebnisse von Kaliumchlorid, -jodid, -bromid sowie Natriumchlorid, -jodid, und -bromid vorgestellt.

Das Fluoreszenzverhalten von 10 μM C6DA in Acetonitril wird in Anwesenheit von 30 μM Analytsubstanz untersucht. Wesentliche Änderungen im Fluoreszenzverhalten wurden dabei nicht gefunden. Jedoch konnten Änderungen hinsichtlich der Fluoreszenzintensität durch Zugabe dieser Analytsubstanzen in eine C6DA-Atropin-Lösung erhalten werden. In allen Fällen wurde bei der eingesetzten Konzentration eine Verstärkung der Fluoreszenz beobachtet. Die jeweilige Änderung ist in einem Verstärkungsfaktor bezogen auf das Referenzsignal der Tabelle 6-2 zu entnehmen. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse konnte gezeigt werden.

Tabelle 6-2
Änderungen des
Atropinsignals im
Beisein von
Schweratomionen
(Faktor bezogen auf
Atropinsignal)

	Cl ⁻	Br ⁻	I ⁻
Na	5.5	4.5	3.6
K	4.3	3.0	1.9

6.5 Diskussion

Im Mittelpunkt der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen von Wirt-Gast-Wechselwirkungen standen die Wirtverbindungen C6DA und deC6DA. In Gegenwart stickstoffenthaltener Substanzen und/oder Verbindungen mit basischen Eigenschaften wurden signifikante Änderungen im Fluoreszenzverhalten beobachtet. Dabei zeigten beide Verbindungen identische Ergebnisse. Strukturelle Unterschiede ergeben sich durch am upper rim der Calixarene vorhandene tert-Butylgruppen am C6DA oder nichtvorhandene Gruppen am deC6DA.

Es wird vermutet, dass die Interaktion zwischen Atropin und C6DA/deC6DA auf mehreren Bindungspunkten beruhen. In Abb. 6-11 wird dies schematisch verdeutlicht. Ausgehend von den sauren Carboxyleinheiten und dem basischen Atropin werden elektrostatische Wechselwirkungen und damit verbunden die Bildung einer Salzbrücke als Ursache der Fluoreszenzänderung angenommen. Auf Basis ionischer Wechselwirkung sind bereits Komplexe zwischen Ammonium-Ionen und Calixarenverbindungen bekannt [52]. Zusätzlich werden die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und die Interaktion von π -Elektronenwolken in die Erklärungen einbezogen. Polyfunktionelle Wirtmoleküle, wie der Bicycloguanidinium-Rezeptor, welcher in ähnlich Weise mit dem hier untersuchten C6DA über drei Bindungspunkte mit der α -Aminosäure Tryptophan reagiert, sind in der Literatur beschrieben [53].

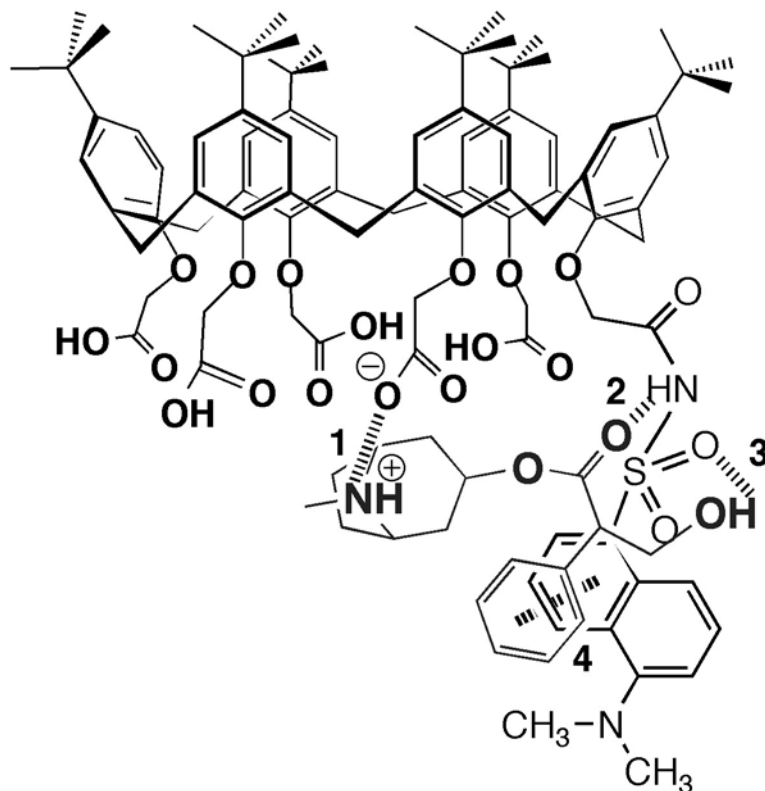


Abb. 6-11

Interaktion zwischen
C6DA und Atropin

- 1 - elektrostatische Wechselwirkung
- 2, 3 - Wasserstoffbrückenbindung
- 4 - π - π -Stacking

Warum signifikante Änderungen im Fluoreszenzverhalten trotz der Vielfalt der zur Verfügung gestandenen Wirtmolekül-Modellverbindungen im Wesentlichen nur bei diesen beiden Calix[6]arenen zu beobachten war, kann in der Komposition aus Dansylamid als fluorophore Einheit und freien Carboxyleinheiten am lower rim des Calixaren-Gerüsts vermutet werden. Dass Vorhandensein der beschriebenen mehrfachen Wechselwirkungsmöglichkeiten am C6DA scheint eine Ursache zu sein. Die Strukturzusammensetzung ist bei keinem der anderen Wirtverbindungen wiederzufinden. Entweder sie enthalten in ihrer Komposition keine freien Carboxylgruppen und/oder anstelle des Dansylamids als fluorophore Einheit wurde Dansylchlorid eingebunden. Somit ist durch die fehlende Amidbindung die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen nicht möglich. Weitere Erklärungen könnten in der durch Anbindung von Substituenten induzierten Erhaltung einer starren Struktur der Wirtverbindung begründet liegen. Dadurch ist die Flexibilität einer Anpassung an den Analyten unterbunden. Weiterhin kann die Bildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zu einer Absättigung der Bindungskapazitäten führen.

Untersuchungen mit ähnlichen Wirtverbindungen, wie dem P64, einem Calix[4]aren mit zwei Carboxyleinheiten und zwei Dansylchlorideinheiten wurden in gleicher Weise dem C6DA durchgeführt. Das Emissionsmaximum liegt um 460 nm. Sowohl durch Zugabe von Atropin oder Scopolaminhydrochlorid als auch durch Simulieren extremer pH-Umgebungen durch Natron-

lauge oder Salzsäure konnten keine signifikanten Änderungen im Fluoreszenzverhalten von P64 beobachtet werden. Die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Amidgruppe des Dansylamids und der Carbonylgruppe des Atropin ist nach den getroffenen Annahmen nicht gegeben. Des Weiteren werden durch die Ankopplung zweier fluoreszierender Einheiten andere Bedingungen für eine Wirt-Gast-Einlagerung schaffen.

Sättigungsverhalten in Gegenwart von Atropin

Die Wirtverbindung C6DA steigt in ihrer Fluoreszenzintensität mit zunehmender Atropinkonzentration. Mit Hilfe fluoreszenz- und NMR-spektroskopischer Methoden konnte gezeigt werden, dass eine 1 : 1 Komplexierung in jedem Fall ausgeschlossen werden kann. In den NMR-Spektren eines C6DA-Atropin-Gemisches im Verhältnis 1 : 3 wurden keine Signale des freien Atropins gefunden. Aus dem Job-Plot der fluoreszenzspektrometrischen Messungen kann eine stöchiometrische Zusammensetzung von 1 : 3 von Wirt : Gast vermutet werden. Allerdings steht dies im Widerspruch zu der erhaltenen Sättigung von C6DA mit Atropin, die erst bei einem 200-fachen Überschuss an Atropin erreicht wurde. Möglicherweise sind andere Effekte einbezogen. Im Fall einer vorliegenden schwachen Wechselwirkung würde die angewandte Methode zur Bestimmung der stöchiometrischen Verhältnisse keine konkreten Aussagen liefern.

Einfluss anderer Lösungsmittel

Betrachtet man den bisher in Acetonitril untersuchten "Atropin-Effekt" in wässriger Lösung so ist eine Interaktion zwischen C6DA und Atropin fluoreszenzspektroskopisch nicht nachweisbar. Es ist zu vermuten, dass durch die Polarität des Wassers die Konkurrenz der Lösungsmittelmoleküle mit den Bindungsstellen zu groß ist und damit der Effekt fluoreszenzspektroskopisch nicht erfasst werden kann. Eine weitere Erklärung könnte in der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wasser und Atropin liegen.

Aus Untersuchungen in Chloroform mit C6DA und Atropin resultieren hinsichtlich der Wellenlängenverschiebung gleiche Ergebnisse. Die Fluoreszenzintensität von C6DA-Atropin ist in Chloroform wesentlich geringer als in Acetonitril.

Wechselwirkung mit Alkaloid-Säurederivaten

Die Zugabe von Alkaloid-Säurederivaten zu einer C6DA-Lösung in Acetonitril führte zunächst zu keinen fluoreszenzspektroskopischen Änderungen. Der Einfluss dieser Alkaloid-Derivate auf das Fluoreszenzverhalten eines C6DA-Atropin-Gemisches ist jedoch signifikant. Eine Fluoreszenzlöschung sowie rückläufige bathochrome Verschiebung zum Referenzsignal wurde beobachtet. Vermutlich liegt die Ursache in der Protonierung des Stickstoffs vom Atropin durch die Säuren begründet. Der protonierte Stickstoff des Atropins

könnte somit keine Wechselwirkung mehr mit der Carboxygruppe des Calixarens eingehen, wodurch die Rückkehr der Fluoreszenz von C6DA zum Ausgangszustand resultiert.

Selektivität und Querempfindlichkeit

Die Selektivität der Wechselwirkung von Atropin und Wirtmolekül C6DA wurde durch Untersuchungen mit strukturell sehr ähnlichen Substanzen wie Hyoscyamin und Scopolamin überprüft. Prinzipiell wurde in beiden Substanzen das gleiche Verhalten wie in Atropin festgestellt. Die Selektivität von C6DA gegenüber einer einzelnen Substanz wird ausgeschlossen, jedoch besteht die Möglichkeit einer Substanzgruppenspezifität unter definierten Umgebungsbedingungen, was für die Anwendung im Sensor-Array vorteilhaft wäre. Die Querempfindlichkeit anderer Verbindungen mit basischen Eigenschaften zeigte, dass die untersuchten Analytverbindungen ebenso eine hypsochrome Verschiebung sowie Intensitätserhöhung im Fluoreszenzverhalten von C6DA analog dem Atropin auslösen.

Halogenid-Effekte

Ausgehend von Löscheffekten durch Säurederivate wurden einige Schweratomverbindungen und ihr Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten von C6DA untersucht. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass das Fluoreszenzverhalten von C6DA-Atropin-Lösungen in Gegenwart von Natrium- oder Kaliumhalogeniden zu Verstärkungen der Fluoreszenzintensität führt. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang mit der bereits bekannten Funktion von p-tert-Butyl-Calixarenen, Metallionen in alkalischer Lösung durch hydrophobe Flüssigmembranen zu transportieren [98]. Die alkalische Umgebung könnte durch die Basizität des Atropin gegeben sein und somit die Kationen im Wirtmolekül komplexieren, was zu einer Verstärkung der Fluoreszenzintensität führt. Dies würde durch die Ergebnisse kaum messbarer Änderungen im Fluoreszenzverhalten des Wirtmoleküls bei alleiniger Anwesenheit der Kationen unterstützt.

Zusammenfassend können Änderungen im Fluoreszenzverhalten des C6DA sowie deC6DA durch verschiedene Einflüsse hervorgerufen werden. Durch Einhaltung definierter Umgebungsbedingungen bzw. das Wissen über in der Probe vorhandene Analytsubstanzen können verschiedene fluoreszenzspektroskopische Parameter von Wirt-Gast-Wechselwirkungen von C6DA bestimmt werden. Die Aktivität potentieller Sondenmoleküle konnte gezeigt werden.

7 Immobilisierung in Hydrogelfilme

Im Zusammenhang mit der Entwicklung eines Chiparrays wurden parallel zur Charakterisierung der fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften der Wirtmoleküle in Lösung Immobilisierungen in einer Hydrogelmatrix durchgeführt. Für die Untersuchungen wurde im Wesentlichen die Wirtverbindung C6DA verwendet, da aufgrund der freien Carboxylgruppen funktionelle Einheiten zur kovalenten Anbindung zur Verfügung standen und damit ein direkter Vergleich zwischen Diffusion und kovalenter Anbindung der Wirtverbindung an die Hydrogelmatrix möglich wird. In Kooperation mit dem IPHT Jena wurden Hydrogelfilme auf der Basis von Polyethylenglykol-bisacrylaten eingesetzt.

7.1 Eigenschaften von PEG-Polymerfilmen

Im Folgenden werden verschiedene Eigenschaften diskutiert, die auf die gewünschte Spezifikation des angestrebten Chiparrays optimiert wurden. Auf den Einfluss verschiedener Polyethylenglykolkettenlängen, der Stabilität sowie dem Funktionalisierungsgrad wird eingegangen.

7.1.1 PEG-Kettenlänge

Die Untersuchungen beziehen sich im Wesentlichen auf Hydrogelfilme, welche unter Verwendung von PEG-Einheiten unterschiedlicher Kettenlängen mit Molmassen von 1900 g/mol und 4000 g/mol synthetisiert wurden. Die Länge der PEG-Kettenlänge beeinflusst die Porengröße der Hydrogelmatrix. Diese ist je nach Art der Immobilisierung, Diffusion oder kovalenten Anbindung, eine entscheidende Größe zum Einschluss bzw. zur Anbindung von Wirtverbindungen. In Abhängigkeit von der Größe des Wirtmoleküls ist die optimale Porengröße zu ermitteln. Es stellte sich heraus, dass die kleinste zur Verfügung stehende Hydrogelmatrix mit Molmassen der PEG-Einheiten von 1900 g/mol für die zu untersuchenden Wirtverbindungen in ihrem Durchmesser zu groß sind, um eine irreversible Bindung durch Diffusion zu erreichen.

Diese Art von modifizierten Hydrogelfilmen kann zur Analytik gasförmiger Substanzen eingesetzt werden. Die Anwendung der Hydrogelmatrix für flüssige Proben bedarf jedoch der kovalenten Anbindung der Wirtverbindungen.

7.1.2 Stabilität

Zur Anwendung für flüssige Proben sowie zur Immobilisierung der Wirtverbindungen durch Diffusion wurde die Stabilität und Beständigkeit der Hydrogelfilme mit PEG-Molmassen von 1900 und 4000 g/mol in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht. Ausgehend von der guten Löslichkeit der Wirtmoleküle in Chloroform wurden diesbezüglich erste Untersuchungen durchgeführt. Vorteilhaft ist dabei die schnelle Flüchtigkeit von Chloroform. Die Hydrogelfilme wurden 30 min in Chloroform inkubiert. Die PEG4000-Hydrogelmatrix ist dabei vollständig aufgequollen und beim anschließenden Trockenvorgang sehr schnell geschrumpft und gerissen, so dass die weitere Verwendung nicht möglich war. Die PEGA-Matrix mit dem kleineren Präpolymer hingegen zeigte keine wesentlichen Veränderungen.

Es ist anzunehmen, dass die bessere Quellfähigkeit der PEG4000-Hydrogelmatrix und damit die größere Aufnahme von Lösungsmittel Ursache für dessen Zerstörung ist. Das Verdampfen von Chloroform führte zu großen inneren Spannungen, die nicht kompensiert werden konnten, so dass die ursprüngliche Form nicht wieder erhalten wurde.

In weiteren Untersuchungen wurde die PEG1900-Hydrogelmatrix in Wasser, Ethanol und Aceton auf ihrer Stabilität geprüft. Dabei wurde eine Schichtdickenquellung um den Faktor 2 beobachtet, welche die Polymerstabilität jedoch nicht beeinflusste.

Weiterhin beeinflusst das eingesetzte PEG-Acrylat entscheidend die Stabilität des Hydrogelfilmes. Aufgrund der leichten Synthetisierbarkeit und Lagerstabi-

lität wurden Hydrogelfilme anfänglich auf Basis von Polyethylenglykol-bis-acrylsäureestern eingesetzt. Die Synthese amidbasierter Hydrogelfilme ist aufwendiger, da die Grundeinheiten erst aus verfügbaren PEGs hergestellt werden müssen. Untersuchungen am IPHT zeigten allerdings, dass die esterbasierten Hydrogelfilme wesentlich instabiler hinsichtlich der Lagerung sind, als amidbasierte Hydrogelfilme. Des Weiteren stellte sich als vorteilhaft heraus, dass amidbasierte Hydrogelfilme sowohl mit Carboxy- als auch Aminogruppen funktionalisiert werden können.

7.1.3 Funktionalisierungsgrad

Die Hydrogelfilme können mit Carboxy- oder Aminogruppen funktionalisiert werden, so dass die kovalente Anbindung der Wirtmoleküle durch die entsprechend komplementären Einheiten ermöglicht wird. Dabei ist eine Aminofunktionalisierung nur im Fall von PEGA nicht aber bei anderen PEG-Acrylaten möglich. Die Funktionsfilme können mit Funktionalisierungsgraden zwischen 10 mmol/l und 1 mol/l bezogen auf das Volumen des ungequollenen Hydrogels bereitgestellt werden. Je höher der Funktionalisierungsgrad, um so mehr Wirtmoleküle könnten kovalent angebunden werden. Jedoch ist bei großen Wirtmolekülen zu beachten, dass ein zu großer Funktionalisierungsgrad zu sterischen Behinderungen der Wirtmoleküle führen könnte. Dies betrifft insbesondere Proteine oder DNA-Stränge. Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurde ein Funktionalisierungsgrad von 20 mM sowie eine Filmdicke im gequollenen Zustand von 10 µm eingesetzt. Das Verfahren ist spotting-kompatibel und kann somit auch für eine lokale Funktionalisierung des Filmes genutzt werden, die mit den entsprechenden funktionellen Gruppen am Wirtmolekül verestert werden können.

7.1.4 Zusammenfassung eingesetzter Hydrogelfilme

Zusammenfassend betrachtet werden im Rahmen der Erkenntnisse für die Immobilisierung von Wirtmolekülen amidbasierte, 20 mM carboxy- oder aminofunktionalisierte Hydrogelfilme mit PEG-Molmassen von 1900 g/mol angewendet. Das PEGA-Harz wird auf einem Glasträger¹ mit einer Dicke von 10 µm aufgebracht und anschließend in Einzelchips von 16 x 25 mm gesägt. Die Stoffmenge der vorhandenen funktionellen Gruppen pro Chip beträgt 0,8 nmol.

¹Durchmesser 10 cm

Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen unbeladener funktionalisierter PEGA-Dünnsfilme zeigten eine Eigenfluoreszenz mit einem Emissionsmaximum um 400 nm. Diese muss in der Auswertung des Fluoreszenzverhaltens der Wirtmoleküle berücksichtigt werden.

7.1.5 Diffusion von Wirtverbindungen

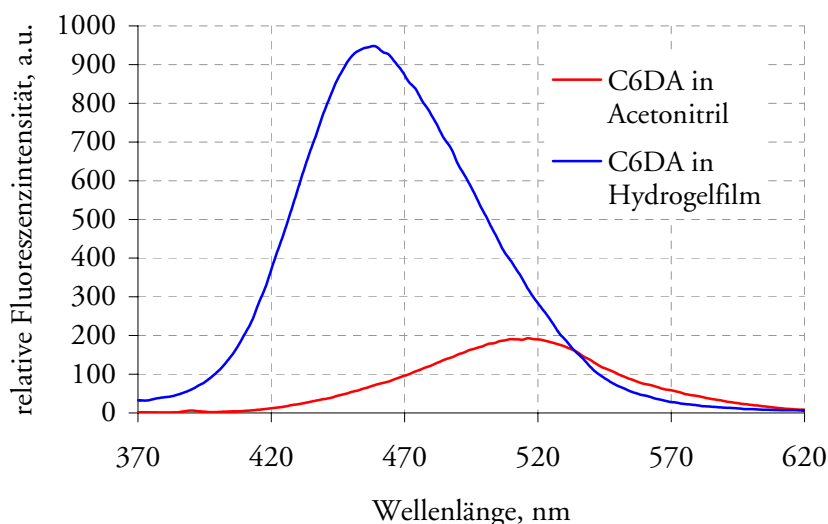
Zur spektroskopischen Charakterisierung diffundierter Wirtmoleküle in PEGA-Hydrogelfilme werden hauptsächlich C6DA und deC6DA eingesetzt,

da aufgrund vorhandener funktioneller Gruppen am Wirtmolekül ein direkter Vergleich zur kovalenten Anbindung gegeben ist. Des Weiteren wird das Fluoreszenzverhalten der Wirtmoleküle 2-15K5A sowie P64 in die Untersuchungen einbezogen.

Ausgehend von den erhaltenen signifikanten Änderungen des Fluoreszenzverhaltens von C6DA in Acetonitril bzw. Aceton bestand das Ziel die in Lösung gewonnenen Erkenntnisse auf die Hydrogelfilme zu übertragen. Unterschiedliche Chargen an PEGA-Hydrogelfilmen wurden für die Immobilisierung eingesetzt. Dabei wurden zum Teil große Unterschiede zwischen den einzelnen Chargen festgestellt, die jedoch nur im Fluoreszenzverhalten von C6DA und deC6DA, nicht aber bei den untersuchten Wirtmolekülen 2-15K5A und P64 beobachtet wurden. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt und diskutiert.

Das Fluoreszenzverhalten eines PEGA-Hydrogelfilms inkubiert mit einer 2 mM C6DA-Lösung in Acetonitril ist in Abb. 7-1 zu betrachten. Das Emissionsmaximum der C6DA-Lösung liegt bei einer Wellenlänge von 520 nm. Hingegen wurde nach Diffusion in eine aminofunktionalisierte PEGA-Hydrogelmatrix ein Emissionsmaximum um 460 nm beobachtet.

Abb. 7-1
Vergleich C6DA/
Acetonitril in Lösung
und im Hydrogelfilm



Die eingesetzte C6DA-Lösung wurde nach der Inkubation mit dem Hydrogelfilm auf mögliche Veränderungen überprüft. Es zeigten sich Änderungen im Fluoreszenzverhalten hinsichtlich des Emissionsmaximums (Abb. 7-2). Eine hypsochrome Verschiebung um 50 nm von zuvor 520 auf 470 nm wurde beobachtet. Intensitätsänderungen wurden in die Betrachtungen aufgrund der unbekannten Menge an diffundierten Molekülen nicht einbezogen.

Die Verwendung einer anderen Charge an bereitgestellten aminofunktionalisierten PEGA-Hydrogelfilme zeigte unter Verwendung der gleichen C6DA-Lösung nach Inkubation dagegen keine Änderungen des Emissionsmaximums gegenüber dem Zustand vor der Inkubation. Das Emissionsmaximum bei 520 nm blieb erhalten. Das Emissionsmaximum der diffundierten Wirtmoleküle in der Matrix lag um 500 nm. Die Ursache für derartige Schwankungen

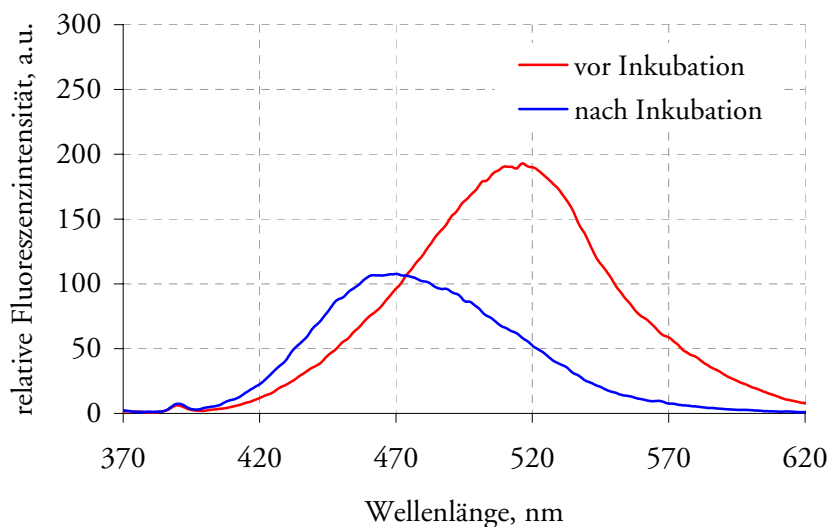


Abb. 7-2
Fluoreszenzverhalten
einer C6DA-Lösung
vor und nach
Inkubation mit dem
PEGA-Harz

ist vermutlich im letzten Schritt der Funktionalisierung von Hydrogelfilmen begründet. Je nach Gründlichkeit der Spül- und Waschschrte verbleibt mehr oder weniger zur Umwandlung der reaktiven Zentren verwendetes Dimethylformamid oder n-Propylamin in der Polymermatrix zurück, was die Änderungen im Fluoreszenzverhalten der Wirtverbindung C6DA auslösen kann. Dies stimmt mit dem beobachteten Verhalten im Beisein von n-Propylamin überein (Abschnitt 6.3). Das Fluoreszenzverhalten von in Dimethylformamid gelöstem C6DA ist in Abb. 7-3 gezeigt. Das Emissionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 460 nm.

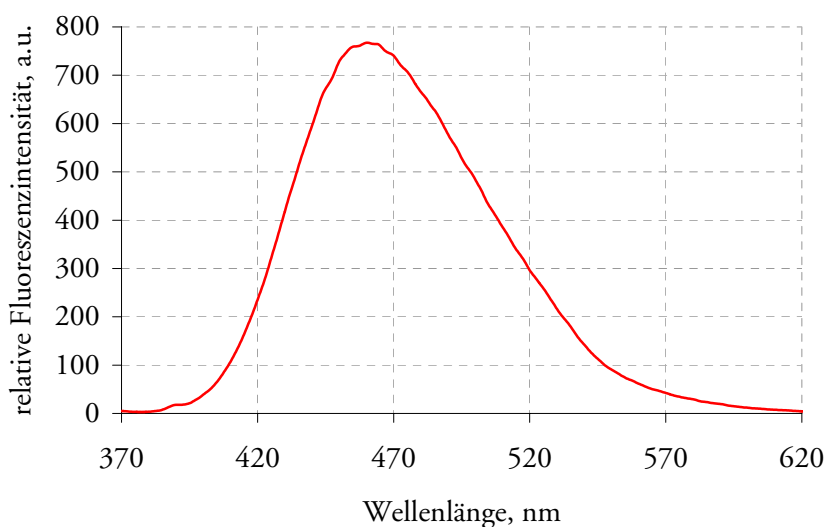


Abb. 7-3
C6DA in DMF

Fluoreszenzverhalten diverser Wirtmoleküle

Gegenstand der Untersuchungen ist der Vergleich des Fluoreszenzverhaltens der Wirtmoleküle 2-15K5A, deC6DA sowie P64 gelöst in Acetonitril nach Diffusion in carboxy- und aminofunktionalisierte PEGA-Hydrogelfilme. Es wurde festgestellt, dass die Fluoreszenzintensitäten der Wirtmoleküle in aminofunktionalisierten PEGA-Hydrogelfilme geringfügig größer sind als in carboxyfunktionalisierten. Beispielhaft sind die Anregungs- und Emissionsspektren der Wirtmoleküle 2-15K5A (Abb. 7-4) und deC6DA (Abb. 7-5) nach Diffusion in dargestellt.

Abb. 7-4
Diffusion von 2-15K5A
in carboxy- und
aminofunktionalisierte
Hydrogelfilme

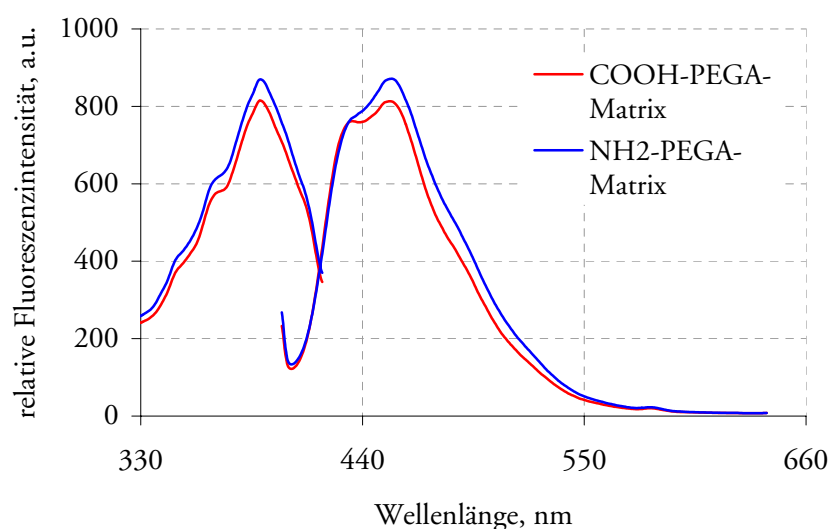
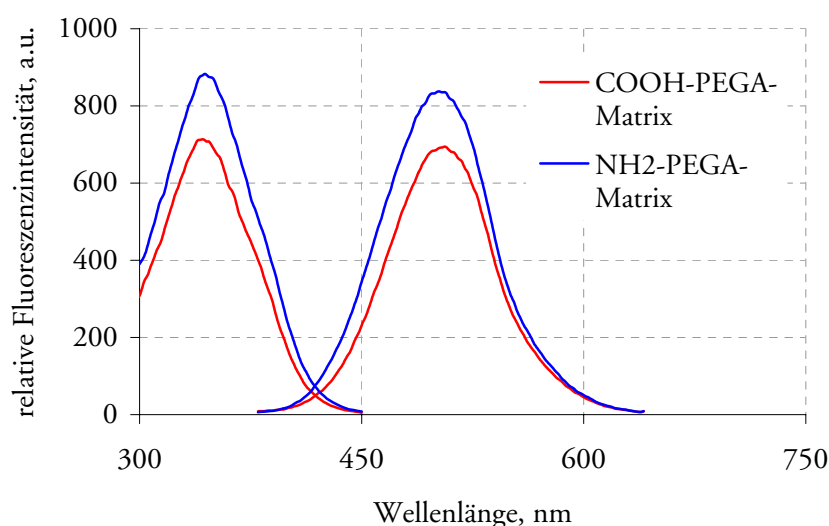


Abb. 7-5
Diffusion von deC6DA
in carboxy- und
aminofunktionalisierte
Hydrogelfilme



Zusammenfassung der Ergebnisse zum Fluoreszenzverhalten diffundierter Wirtmoleküle

Die spektralen Eigenschaften hinsichtlich des Emissionsmaximums sind im Fall der Untersuchungen mit dem Wirtmolekül C6DA gegenüber den anderen eingesetzten Wirtmolekülen in Abhängigkeit von der Charge der Hydrogelfilme nicht identisch. Das Emissionsmaximum schwankt zwischen 460 nm und 510 nm. Die Ursache liegt vermutlich in den Unterschieden der noch in der Matrix verbliebenen Lösungsmittel, wie Dimethylformamid, begründet. Im Abschnitt 4.3.2 wurde bereits das Fluoreszenzverhalten von C6DA in Abhängigkeit von der Umgebung beschrieben. Potentiell könnten in Hydrogelfilmen somit verschiedene Bedingungen für Wirtverbindungen geschaffen werden. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit die Bedingungen auf Wirt-Gast-Wechselwirkungen mit verschiedensten Analyten anzupassen.

Es wurde weiterhin festgestellt, dass die Fluoreszenzintensität der untersuchten Wirtmoleküle 2-15K5A, deC6DA sowie P64 in aminofunktionalisierten PEGA-Hydrogelfilme im Vergleich zu carboxyfunktionalisierten Schichten größer ist. In der Regel wurde eine Verstärkung auf das 2-fache beobachtet.

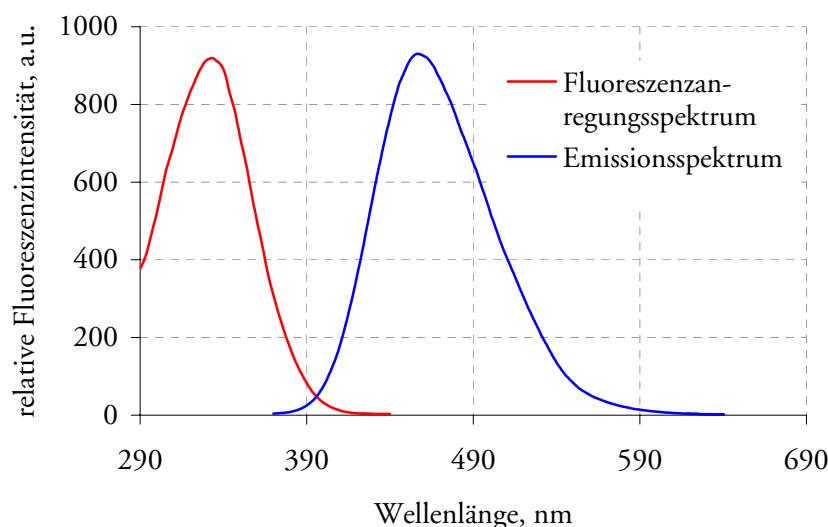
Hinsichtlich des Fluoreszenzverhaltens nach Diffusion in die Hydrogelmatrix wurden in allen Wirtmolekülen nach Inkubation mit flüssigen Analytsubstanzen Auswascheffekte beobachtet. Die mit diffundierten Wirtverbindungen beladenen Hydrogelfilme scheinen daher nur für den Einsatz gasförmiger Analytsubstanzen geeignet. Da die Diffusion der Wirtverbindungen in die Hydrogelfilme nicht irreversibel ist und diese wieder entfernt werden können, erfordert die sensorische Anwendung für flüssige Proben eine andere Möglichkeit der Immobilisierung. Die Wirtverbindungen müssen kovalent an die Hydrogelfilme gebunden werden.

7.2 kovalente Anbindung

Ausgehend von vorhandenen freien funktionellen Gruppen am Wirtmolekül wurde hauptsächlich das Fluoreszenzverhalten von C6DA und deC6DA in aminofunktionalisierten PEGA-Hydrogelfilmen untersucht. Die kovalente Anbindung erfolgt dabei über die Carboxylgruppe des Wirtmoleküls und die freien Aminogruppen der Hydrogelmatrix (siehe Abschnitt 3.2.6).

Die Wirtmoleküle C6DA und deC6DA sind in ihrem Fluoreszenzverhalten, wie bereits in Lösung beobachtet, im Hydrogelfilm identisch. Sie müssen daher nicht getrennt voneinander betrachtet werden. In Abb. 7-6 sind das Anregungs- und Emissionsspektrum von deC6DA, kovalent angebunden an eine aminofunktionalisierte Hydrogelmatrix, dargestellt. Das Emissionsmaximum befindet sich bei 460 nm. Chargenabhängige Schwankungen des Emissionsmaximums wurden nicht beobachtet. Dies kann auf das zur kovalenten Anbindung verwendete Lösungsmittel Dimethylformamid, in welchem die Wirtverbindung gelöst vorlag, zurückgeführt werden.

Abb. 7-6
Anregungs- und
Emissionsspektrum
von deC6DA kovalent
angebunden an
aminofunktionalisierte
Schicht
2 μ M C6DA in DMF



Des Weiteren wurden Untersuchungen der kovalent angebundenen C6DA-Moleküle in Ethanol und Wasser durchgeführt. Im Vergleich zur trockenen Schicht mit einem Emissionsmaximum um 460 nm konnten in Umgebung von Ethanol und Wasser Änderungen im Emissionsmaximum gefunden werden. In Ethanol wurde ein Maximum bei 475 nm beobachtet, wo hingegen dieses in Wasser bei 495 nm liegt.

Im Vergleich zu den beiden Wirtmolekülen mit freien Carboxyleinheiten wurde das Dansylamid als Fluorophor ebenfalls aufgrund seiner freien funktionellen Amidgruppe zur Anbindung an eine PEGA-Hydrogelmatrix eingesetzt. Dadurch konnten zwei Funktionen anhand eines Moleküls überprüft werden. Zum einen ist ein Vergleich des Fluoreszenzverhaltens von Dansylamid zum Wirtmolekül möglich. Das Maximum im Emissionsspektrum von Dansylamid liegt bei 440 nm gegenüber dem Emissionsmaximum bei 460 nm im Wirtmolekül. Die relative Fluoreszenzintensität des Dansylamids ist gegenüber dem Wirtmolekül ungefähr um das 4-fache geringer. Die eingesetzten Konzentrationen zur Immobilisierung sind gleich und entsprechen 2 mM. Zum anderen konnte mittels Dansylamid die kovalente Anbindung an einer carboxyfunktionalisierten Hydrogelmatrix gezeigt werden.

Konzentrationsabhängige Untersuchungen zur Immobilisierung der Wirtmoleküle stellten einen weiteren wichtigen Punkt dar. Aus Abb. 7-7 wird ersichtlich, dass das Fluoreszenzverhalten der Wirtmoleküle in Hydrogelfilmen äquivalent zur Konzentration der immobilisierten Wirtmoleküle ist. Beispielhaft dargestellt sind die Emissionsspektren einer 100%-igen 2 mM C6DA-Lösung im Vergleich zu einer 60%-igen 2 mM C6DA-Lösung.

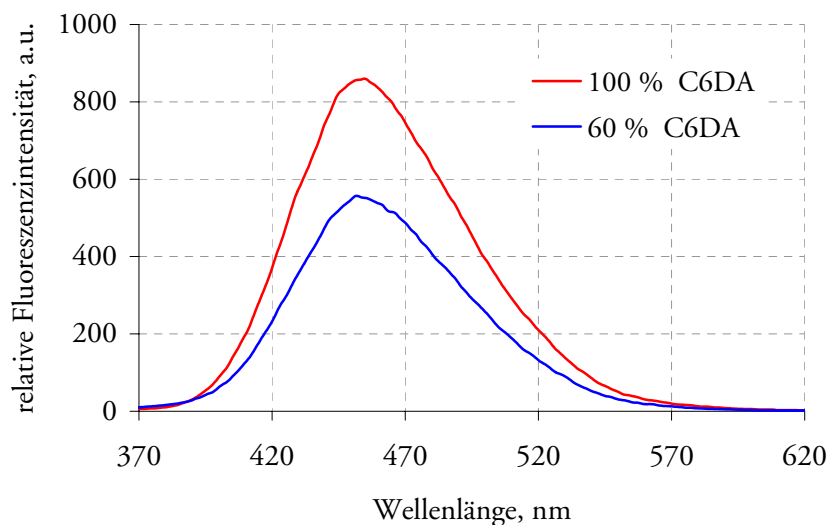


Abb. 7-7
Abhängigkeit der
Fluoreszenzintensität
von der Menge
immobilisierter
Wirtmoleküle

Diskussion der Ergebnisse zum Fluoreszenzverhalten kovalent angebundener Wirtmoleküle

Für die Untersuchungen zur kovalenten Anbindung von Wirtmolekülen wurden die Wirtmoleküle C6DA und deC6DA eingesetzt. Die Carboxyleinheit dient zur Veresterung mit der aminofunktionalisierten PEGA-Hydrogelmatrix. Die Funktionsweise der kovalenten Anbindung von Wirtverbindungen an carboxyfunktionalisierte PEGA-Hydrogelfilme konnte mittels Dansylamid modellmäßig gezeigt werden. Somit stehen zwei verschieden funktionalisierte PEGA-Hydrogelfilme zur kovalenten Anbindung von Wirtverbindungen mit entsprechender Funktionalität zur Verfügung.

Des Weiteren wurden keine Schwankungen im Fluoreszenzverhalten hinsichtlich des Emissionsmaximums der diffundierten Wirtmoleküle in Abhängigkeit von der Hydrogelcharge bei kovalenter Anbindung beobachtet. Das Emissionsmaximum befindet sich bei 460 nm. Dieses wird auf die Verwendung von Dimethylformamid als Lösungsmittel zurückgeführt, da sich das Emissionsmaximum von C6DA in Lösung ebenfalls bei 460 nm befindet.

7.3 Wechselwirkungen in PEGA-Filmen

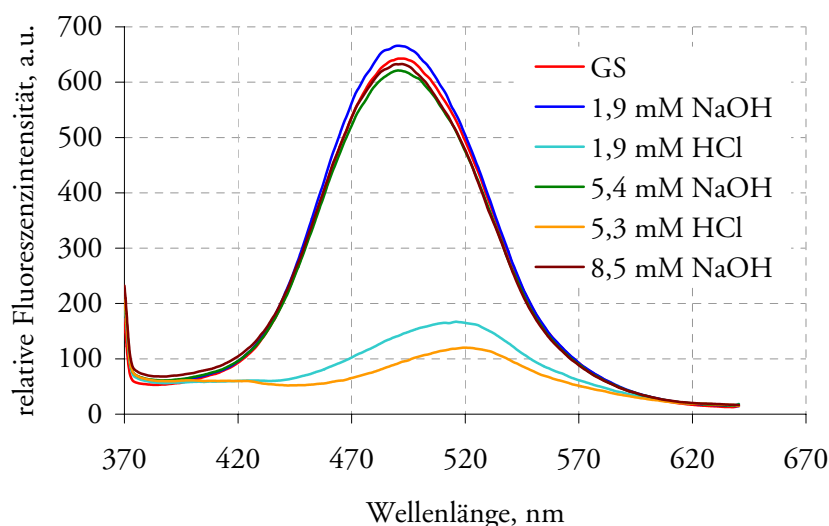
Die Untersuchungen beschränken sich im Wesentlichen auf die Überführung von den in Lösung festgestellten Effekten, bei denen sich deutliche Änderungen im Fluoreszenzverhalten der Wirtmoleküle in Gegenwart eines Analyten gezeigt haben. Im Folgenden wird die pH-Abhängigkeit des Fluoreszenzverhaltens von C6DA in der Hydrogelfilm im Vergleich zu Wechselwirkungen von Atropin und Scopolaminhydrochlorid dargestellt.

Aufgrund der Auswaschung von diffundierten Wirtmolekülen sind Experimente in Lösung nur mit kovalent angebundenen Wirtmolekülen möglich. Erste Untersuchungen diffundierter Wirtmoleküle wurden mit Analyten in Gasphase durchgeführt.

7.3.1 Kovalent angebundenes C6DA in wässriger Umgebung - Einfluss pH-Änderung

Kovalent an das Hydrogel immobilisiertes C6DA ändert sein Fluoreszenzverhalten, ähnlich wie in Lösung bereits beschrieben, in Abhängigkeit vom pH-Wert der Umgebung. In Abb. 7-8 ist das Fluoreszenzverhalten einer C6DA enthaltenen Hydrogelmatrix in wässriger Umgebung in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt.

Abb. 7-8
Kovalent
angebundenes C6DA
unter verschiedenen
sauren und basischen
Bedingungen



Die Messungen wurden jeweils 5 min nach Änderung des pH-Wertes durchgeführt. Das Grundsignal in wässriger Umgebung zeigt ein Emissionsmaximum bei 490 nm. Es zeigt sich, dass anhand des Fluoreszenzverhaltens der immobilisierten Wirtmoleküle extrem basische von sauren Bedingungen unterschieden werden können. Zur Durchführung dieser Experimente wurde abwechselnd Natronlauge und Salzsäure zugegeben. Die Emissionsmaxima verschieben sich dabei von 490 nm im Basischen zu 520 nm in saurer Umgebung.

7.3.2 Kovalent angebundenes C6DA - und Atropin/Scopolaminhydrochlorid-Wechselwirkung

Zur Abschätzung des Wechselwirkungsverhaltens kovalent angebundener Wirtverbindungen wurde das Fluoreszenzverhalten von immobilisiertem C6DA in der Umgebung von Scopolaminhydrochlorid und Atropin experi-

mentell untersucht. Die bereits in Lösung festgestellten signifikanten Effekte sollen in Hydrogelfilmen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Untersuchungen in Abhängigkeit vom pH-Wert wurden in diesem Fall die Hydrogelfilme nach Inkubation mit dem Analyten getrocknet und erst dann fluoreszenzspektroskopisch vermessen.

Das Emissionsmaximum von C6DA im Hydrogelfilm liegt zu Beginn der Messungen bei 460 nm. Die Inkubation mit Atropin führte zunächst zu keinen Änderungen im Fluoreszenzverhalten. Erst nach Inkubation der C6DA-Schicht mit Scopolaminhydrochlorid konnten spektrale Veränderungen hinsichtlich Emissionsmaximum sowie Intensität beobachtet werden. In Tabelle 7-1 sind die Ergebnisse von zwei C6DA-enthaltenen Hydrogelfilmen abwechselnd inkubiert in Scopolaminhydrochlorid- und Atropin-Lösung dargestellt. Das Emissionsmaximum verschiebt sich dabei von 460 nm in Atropinumgebung zu 510 nm in Hydrochlorid-Umgebung.

	GS	Scopolamin- hydrochlorid 30 min	Atropin 30 min	
Schicht 1	1.00	0.15	0.98	
	GS	Scopolamin- hydrochlorid 45 min	Atropin 30 min	Atropin 15 min
Schicht 2	1.00	0.16	0.76	1.04

*Tabelle 7-1
Schicht abwechselnd
inkubiert in
Scopolaminhydro-
chlorid (7,5 mM),
anschließend
getrocknet,
vermessen, inkubiert
mit Atropin (10 mM)
(Auswertung bei
 $\lambda = 450 \text{ nm}$)*

Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass die Zugabe von Scopolaminhydrochlorid zur Verringerung der Fluoreszenzintensität von C6DA im Hydrogelfilm führt. Die anschließende Inkubation mit Atropin führt wieder zur Ausgangsintensität zurück. Die spektralen Änderungen sind vergleichbar mit den in Lösung erzielten Ergebnissen. Unterschiede ergeben sich in der Ausgangssituation¹ beider Ergebnisse. Betrachtet man das Verhalten in Lösung, so entspricht der Ausgangszustand dem Verhalten nach Zugabe von Scopolaminhydrochlorid mit Emissionsmaximum um 520 nm. Im Vergleich dazu kann der Referenzzustand im kovalent angebundenen Zustand in der Polymermatrix eher dem Atropinverhalten mit Emissionsmaximum um 460 nm zugeordnet werden.

¹Referenzprobe

Zusammenfassend betrachtet konnten die in Lösung erhaltenen Änderungen des Fluoreszenzverhaltens der Wirtverbindungen C6DA und deC6DA ebenso in einer Hydrogelmatrix detektiert werden. Damit konnten wesentliche Erkenntnisse in Hinblick auf das zu entwickelnde Sensorsystem erhalten werden.

8 Thermodesorption - Konzeption eines Kalibrierverfahrens

Die Auswahl einer Referenzmethode ist für die Entwicklung des Sensorsystems sowie für den späteren Einsatz von entscheidender Bedeutung. Da die Erfassung von Substanzen und Substanzprofilen für die Charakterisierung von Produkten im Vordergrund steht, ist ein Referenzverfahren zu wählen, dass es ermöglicht qualitativ und quantitativ Substanzgemische zu bewerten. Durch Beziehungen zur optischen Auslese des Sensorchips können für eine Kalibrierung wichtige Grundlagen geschaffen werden

8.1 Allgemeines

Während der Entwicklung des angestrebten Sensorsystems wie auch zur Kalibrierung von Chipvarianten für den Einsatz im Sensorsystem ist die Verwendung eines bewährten analytischen Verfahrens als Referenz für die Einzelsubstanz- und Profilbestimmung notwendig. Der Bezug zu einem derartigen Verfahren macht die Bewertbarkeit der mit dem Sensor erhaltenen Ergebnisse möglich.

Es bestand also im Weiteren das Ziel, ein Verfahren zur Kalibrierung der an den eingesetzten Sondenmolekülen angelagerten bzw. eingelagerten Analytsubstanzen zu entwickeln. Hierzu wurde der Einsatz einer kombinatorischen Methode von optischer Detektion und GC/MS angestrebt.

Die Sensorchips können in einem Detektionsaufbau mit Hilfe der Kamera optisch ausgelesen werden. Durch diese zerstörungsfreie Methode ist es im Anschluss daran möglich, die Analyten von der Sensorschicht mittels Desorption zu lösen und auf das Chromatographiesystem zu leiten. Es kann also mit dem selben Chip eine Aussage aus beiden Verfahren gewonnen und z.B. für die Kalibration oder Anlernphase entscheidende Verknüpfungen gezogen werden. Damit die angesprochene Verwendung beider Methoden ohne Verlust erfolgen kann, ist ein Konzept für die Kompatibilität der Peripherie am Chipmodul erforderlich gewesen.

Neben prinzipiellen Untersuchungen beschichteter Chips mit der HS-SPME-GC/MS wird die Konzeption eines angepassten Thermodesorptionssystems dargestellt.

8.2 Stabilität der PEGA-Hydrogelfilme

Der Einsatz einer thermischen Desorption für die Entwicklung und späteren Kalibrierung von Sensorchips sowie deren Regenerierung setzt voraus, dass die dem Prozess zu unterziehenden Einheiten ausreichend temperaturstabil sind. Der kritische Punkt des Chipaufbaus ist dabei die PEGA-Schicht. Diese war auf entsprechende Stabilität zu prüfen.

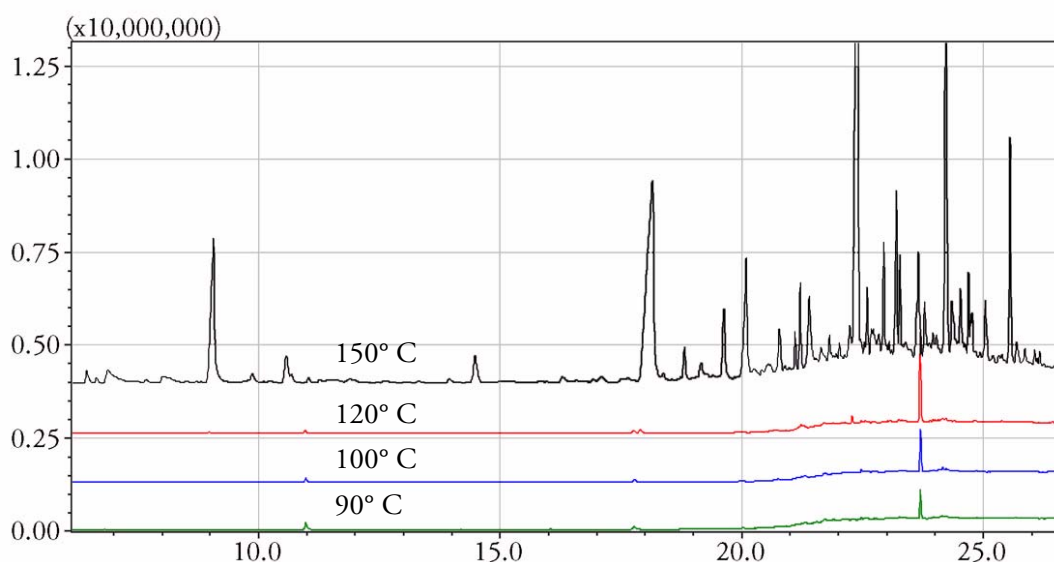
Aminofunktionalisierte PEGA-Hydrogelfilme wurden mittels HS-SPME bei verschiedenen Headspace-Temperaturen 90° C, 100° C, 120° C und 150° C untersucht. Dazu wurden die Schichten bei der jeweils eingestellten Headspace-Temperatur folgender Vorgehensweise unterzogen:

Vorinkubation:	10 min
Inkubation:	15 min
Adsorption:	15 min

Nach Überführung der an die SPME-Faser adsorbierten Moleküle in den GC-Injektor erfolgte die gaschromatographische Auftrennung und die Detektion mittels gekoppeltem Massenspektrometer. Die bei den vier Temperaturen erhaltenen Chromatogramme sind in Abb. 8-1 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass bis zu einer Temperatur von 120° C keine sichtbare Zersetzungsproduktbildung auftritt. Erst bei einer Inkubationstemperatur von 150° C ist ein enormer Anstieg an erfassbaren Substanzpeaks zu sehen. Allein

das Auftreten von Substanzen, die bei geringeren Inkubationstemperaturen nicht auftreten, deutet auf die Zersetzung der Schicht hin. Identifikationen aller neu entstandenen Peaks zeigen an Hand von Bibliothekseinträgen der Massenspektren keine eindeutigen Ergebnisse. Nahezu alle Massenspektren der Peaks im Chromatogramm führen zu einem identischen Vorschlag der Suchroutine.

Abb. 8-1
Vergleich der bei verschiedenen Inkubationstemperaturen abgegebenen Substanzanzahl



Betrachtet man die Massenspektren im Detail, fällt auf, dass nahezu in allen Spektren die Masse 73 m/z eine der Hauptmassen darstellt. In der Abb. 8-2 ist ein Beispielspektrum eines Peaks mit der Retentionszeit von 21,1 min gezeigt. Betrachtet man die chemische Struktur des Hydrogelfilms, wie sie in Abb. 2-6 dargestellt wurde, können Rückschlüsse gezogen werden. Der Massepeak bei 73 m/z deutet auf Bruchstücke aus der Hydrogelstruktur des PEG's hin.

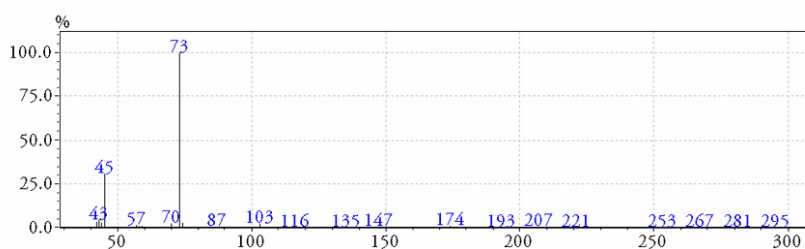


Abb. 8-2
Massenspektrum des Peaks RT=21,1 min des Chromatogramm bei 150° C Inkubationstemperatur

Thermische Zersetzungsprodukte mit Teilen der Hydrogelkette $-\text{[OCH}_2\text{-CH}_2\text{]}_n\text{-}$ treten in unterschiedlicher Konfiguration und mit verschiedenen funktionellen Gruppen auf. Diese ergeben eine Vielzahl an Peaks im Chromatogramm mit unterschiedlichen Retentionszeiten. Als Ionisationsbruchstück wird aus der Kettenstruktur $\text{CH}_3\text{-OCH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2^+$ im Massenspektrometer mit der Masse 73 m/z detektierbar.

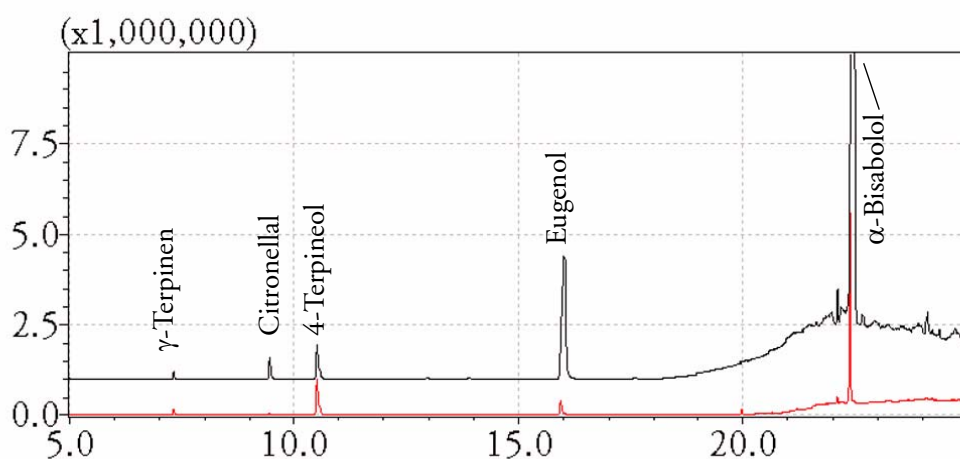
8.3 Analytbeladene Chipoberflächen

Zur Bestimmung der Funktionsfähigkeit der angestrebten Kalibrationsmethode wurden Sensorchips zunächst mit Hilfe von Terpenen als Analytmoleküle charakterisiert. Dazu wurden verschiedene Chips der Größe 10 x 20mm unbeschichtet, mit 10 µm PEGA-Hydrogelfilm beschichtet sowie mit Wirtmolekül immobilisierte 10 µm PEGA-Hydrogelfilme mit Terpen-Gas inkubiert und anschließend gaschromatographisch analysiert. Zur umfassenden Betrachtung wurden unterschiedliche Terpen-Zusammensetzungen getestet.

In Abb. 8-3 ist beispielhaft das Chromatogramm der reinen Terpenmischung und einer mit dieser Mischung inkubierten 10 µm PEGA-Hydrogelmatrix im Vergleich dargestellt. Deutlich zu erkennen sind die einzelnen Peaks der Terpenkomponenten in beiden Chromatogrammen. Unterschiedliche Anreicherungsintensitäten auf der Schicht lassen sich aus den Flächen-Verhältnissen ableiten. Quantitativ ist eine Aussage auf Basis der vorliegenden Daten noch nicht möglich. Hierzu sind Bedingungen weiter zu optimieren.

Da es sich bei dem gezeigten Ergebnis um eine nicht mit Wirtmolekül inkubierte Schicht handelt, wird daraus ein grundlegendes Verhalten deutlich. Die eingesetzte Immobilisierungsschicht bildet selbst einen Adsorber, der Analytmoleküle aufnimmt. Ergebnisse mit inkubierten Wirtmolekülen zeigen ähnliche Ergebnisse, so dass eine Unterscheidung bisher nicht sicher durchgeführt werden konnte. Da es sich hierbei aber um erste Grundversuche handelt, sind endgültige Aussagen noch nicht zu treffen. Es zeichnet sich aber ab, dass für eine Kalibrierung mittels GC/MS die Optimierung der Immobilisierungsstrategie erforderlich wird. Für Entwicklungsaspekte des Sensorsystems sowie die Bewertung der Regeneration von Chipoberflächen ist die eingeschlagene Richtung Erfolg versprechend.

Abb. 8-3
GC/MS-
Chromatogramme
eines reinen Terpen-
gemisches (schwarz)
und aus einer mit dem
Terpengemisch
inkubierten PEGA-
Schicht (rot)



8.4 Konzeption des Thermodesorbers

Die spezielle Form und Anwendung der Sensorchips erforderte eine zugeschnittene Desorptionseinheit. Verfügbare Standardsysteme für Thermodesorption konnten nicht eingesetzt werden. Dies lag insbesondere daran, dass die Desorptionskammern für die Chipdimensionen von 16 x 25 mm und 1,4 mm Dicke ungeeignet waren.

Das Grundprinzip einer Thermodesorption wird auch wie in allen anderen verfügbaren Systemen in dem Chipthermodesorber umgesetzt. Dabei sind eine thermische Einheit zum Aufheizen des Probenmediums und die Überführung durch ein Trägermedium Voraussetzung.

Die Erhöhung der Temperatur führt zur gewünschten Verschiebung des Phasengleichgewichtes der Analyten zu Gunsten der gasförmigen Phase. Durch das strömende Trägergas wird die Gleichgewichtseinstellung fortlaufend gestört, so dass die Analytmoleküle bis zur vollständigen Verarmung der Sensorschicht ausgetragen werden können.

In der Abb. 8-4 ist das Konzept der speziellen Umsetzung des Chipthermodesorbers dargestellt.

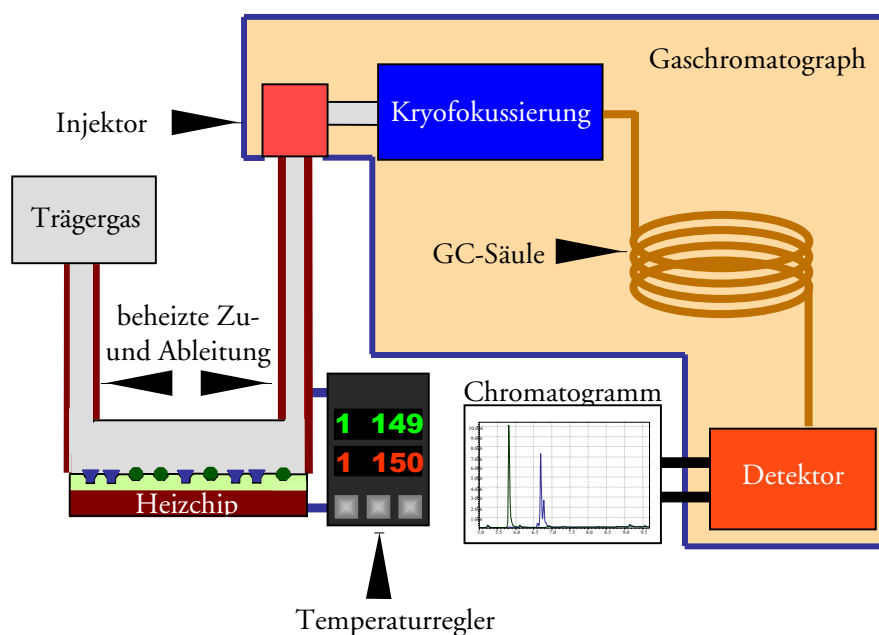


Abb. 8-4
Konzept der
Thermodesorptions-
einheit

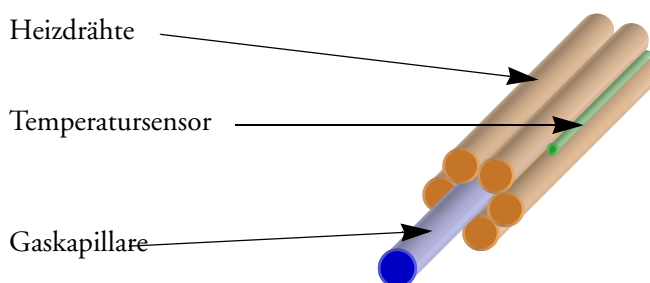
Das GC-Trägergas dient auch für die Thermodesorption als Trägermedium. Die Zuleitung aus der Druckgasflasche wird bereits auf die Desorptionstemperatur vorgeheizt. Das erlaubt eine Desorption auf kleinstem Raum, da im Einstrombereich des Gases in die Desorptionskammer kein Temperaturgradient entsteht. Die am Sensorchip direkt eingebrachte Wärmeenergie durch den darunter liegenden Heizchip dient also nur zur Aufheizung des mit Analyten belegten Sensorchips. Zur Vermeidung von Kondensation der desorbierten Analyten an der Innenwand der Zuleitungskapillare zum GC-System ist auch diese Kapillare auf mindestens Desorptionstemperatur zu halten. Für die Zu-

und Ableitung des Gasflusses werden auf der Innenwand unbeschichtete Glaskapillaren eingesetzt.

Die Abb. 8-5 zeigt den schematischen Aufbau der Kapillartemperierung. Mehrere Heizdrähte umgeben die Kapillare. Die Heizdrähte sind in axialer Richtung zur Kapillare angeordnet, so dass diese vollständig von den Drähten umgeben ist. Ein Temperatursensor ist direkt auf die Außenseite der Heizdrähte aufgebracht. Zusätzlich wird der gesamte Aufbau von einer Ummantelung umgeben, die neben der Isolationswirkung auch eine mechanische Stabilisierung erreicht.

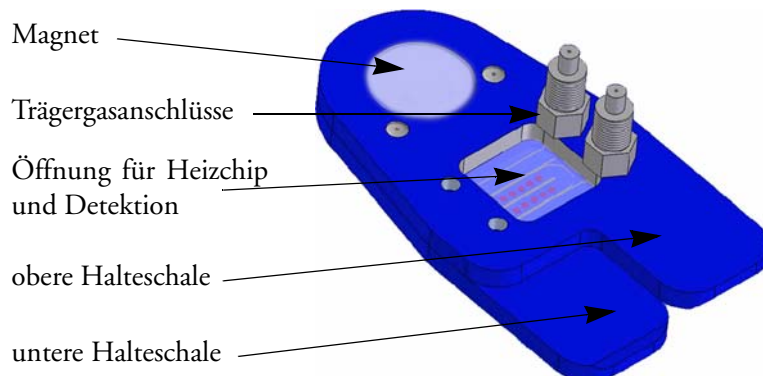
Der hier geschilderte Aufbau stellt sicher, dass die gewünschte Temperatur in der Kapillare erreicht wird. Durch das vollständige Umgeben der Kapillare mit Heizdrähten werden Temperatursenken umgangen und erreicht, dass die vom Sensor ermittelte Temperatur kleiner oder gleich der Kapillartemperatur ist.

Abb. 8-5
Anordnung von
Heizdrähten um die
Gaskapillaren



Eines der wesentlichen, besonderen Merkmale der Desorptionseinheit ist die Halterung des Sensorchips. Diese ist kompatibel zur Aufnahme in der Detektionseinheit und bietet dadurch eine Reihe von Vorteilen. Zum einen können entwickelte Komponenten mehrfach verwendet werden. Das reduziert den Entwicklungsaufwand, da gleiche Probleme wie Einpassung des Chips, Fluidführung und Dichtigkeit zu lösen waren. Zum anderen wird dadurch die Vergleichbarkeit zwischen der Anwendung als Sensorchip und der Kalibrierung gewährleistet. In beiden Fällen herrschen die gleichen Bedingungen in der Chiphalterung, was die bereits angesprochene gleichzeitige Verwendbarkeit von optischer Detektion und Kalibrierung mittels GC/MS unterstützt.

Abb. 8-6
Sensorchiphalterung
für die
Thermodesorption



In der Abb. 8-6 ist das Haltermodul dargestellt. Es besteht im Wesentlichen aus zwei Halteschalen, die mit zwei Magneten zusammen in definierter Position gehalten werden. In die untere Schale kann der Chip eingelegt werden. Durch Übereinanderbewegen der Schalen in die Verschlussposition werden diese durch die Magnetkraft gegeneinander gedrückt und erreichen durch Dichtringe die Abdichtung der fluidischen Zuleitungen zu den Anschlüssen am Chip [128,129].

In beiden Halteschalen befinden sich im Bereich des Chips Öffnungen für die optische Detektion. In die gleiche Öffnung wird nach dem Einlegen des Chips in die Desorptionshalterung von unten ein Heizchip eingebracht, der die Temperierung der Sensorschicht für die Desorption übernimmt. Die Abb. 8-7 zeigt den eingesetzten Heizchip, hergestellt von der Firma Clondia, mit Heizer- und Sensorstrukturen sowie der Zuleitung. Die Dimension des Heizchips ist für die zu untersuchenden Sensorchips sehr gut geeignet. Es lässt sich somit eine optimale, ganzflächige Temperierung des Sensorchips erreichen. Eine Anpressfeder stellt den thermischen Kontakt zwischen den beiden Chipoberflächen her.

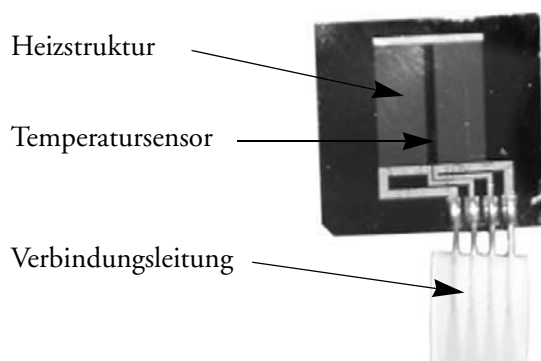


Abb. 8-7
Verwendeter Heizchip
für die Temperierung
des Sensorchips

Die Leitungs- und Chiptemperierung sollen dafür sorgen, dass eine effektive Desorption und ein verlustfreier Transfer zum GC erfolgen können. Die Steuerung der Temperaturen dieser einzelnen Module erfolgt durch eine zentrale Steuereinheit, die einen PID-Regler darstellt. Es kann dort für jede zu regelnde Einheit unabhängig eine Temperatur gewählt werden.

Zu Beginn der GC-Trennsäule ist eine Fokussierung aller Analytmoleküle erforderlich, da die Desorption ein zeitabhängiger Prozess ist. Die nacheinander die GC-Trennsäule erreichenden Moleküle werden im konkreten Fall durch eine Kryofokussierung am Beginn der Säule [113] durch extremes Absenken der Temperatur in diesem Säulen-Bereich fest gehalten. Erst nachdem alle Moleküle desorbiert und fokussiert sind, wird die Temperatur im Fokussierbereich erhöht und damit die Trennung durch die GC gestartet. Es kann also gesichert werden, dass bis zum vollständigen Verarmen der Schicht alle Analytmoleküle auf der Trennsäule gesammelt werden.

Die Umsetzung und Realisierung des Konzeptes der Thermodesorption in einem ersten Funktionsmustersaufbau ist in [125] beschrieben. Inbetriebnahme und Funktionstests des Aufbaus zeigten einige wesentliche Punkte zur Überar-

beitung. Insbesondere betrifft das die Anschlusstechnik und die Dichtungen. Der rein technische Funktionsnachweis der Temperaturreglung und -stabilität konnte in dem ersten Schritt erbracht werden. Da für die reale Anwendung und Testung die Überarbeitung abgeschlossen sein muss, konnten bisher noch keine Daten für die Desorption am Chip generiert werden.

9 Zusammenfassung und Ausblick

Das wachsende Bestreben zur Miniaturisierung von Systemen bzw. Systemkomponenten bietet auf dem Gebiet der Analytik ein enormes Forschungspotential. Neben miniaturisierten Messsystemen ist die Suche nach sensitiven und zum Teil selektiven Materialien von großem wissenschaftlichem Interesse. In Anlehnung an in der Natur vorkommenden komplexen spezifischen Erkennungssystemen stellen synthetisch hergestellte Wirtmoleküle in zunehmendem Maße ein äußerst effektives Mittel zur gruppenspezifischen bzw. selektiven Detektion von Substanzgemischen bzw. deren Einzelkomponenten dar. Im Rahmen der Arbeit wird die Fluoreszenzdetektion zum Nachweis von Wirt-Gast-Wechselwirkungen angewendet. Bereitgestellte anthracenmarkierte 15-Krone-5-Verbindungen und dansylmarkierte Calix[4]arene sowie Calix[6]arene unterschiedlichster Substitutionen bildeten die Basis der Untersuchungen. Umfangreiche Untersuchungen zur Charakterisierung fluoreszierender Wirtverbindungen wurden durchgeführt. Zum einen wurden die grundspektroskopischen Eigenschaften der Absorption und Fluoreszenz dieser Verbindungen in Lösung untersucht. Der Einfluss verschiedener Umgebungsbedingungen wie Polarität oder pH-Wert wurde fluoreszenzspektroskopisch charakterisiert und an zwei Wirtverbindungen beispielhaft dargestellt. Insbesondere die Kronenetherverbindung 15K5A zeigt dabei ein komplexes, interessantes duales Fluoreszenzverhalten in wässriger Lösung. Das Besondere sind dabei die enorm langsamen spektralen Änderungen im Emissionsspektrum über einen Zeitraum von mehreren Stunden, währenddessen sich das Absorptionsverhalten nahezu konstant verhält. Durch eine gezielte Steuerung des Prozesses wäre der Einsatz als molekularer Schalter in der Sensorik denkbar.

Zum anderen wurden umfangreiche Untersuchungen mit potentiellen Analytsubstanzen unterschiedlichster Substanzklassen in Lösung durchgeführt. Dieses Screening ist erforderlich gewesen, da es prinzipiell keine ableitbaren konkreten Struktur-Wechselwirkungs-Erkenntnisse gibt. Dabei wurden insbesondere Vertreter der Terpene, Aminosäuren und Alkaloide als Modellanalyte betrachtet. Die experimentellen Befunde der Wirtverbindungen zeigten in der Regel in Gegenwart der Modellanalytsubstanzen Änderungen im Fluoreszenzverhalten kleiner als 20 %. Als signifikant wurden bezüglich der Schwankungsbreite der Grundsignale von 5 % Änderungen von 15 % angenommen. Dies entspricht einer Nachweisgrenze der dreifachen Rauschbreite des Grundsignals. Die diesbezüglich als signifikantes Ergebnis erhaltenen Änderungen konnten jedoch nicht erfolgreich reproduziert werden. Ursachen können zum einen in der konformativ bedingten Begrenzung der zur Verfügung stehenden Ringgröße der Kronenverbindungen sowie Kavitäten der Calixarenverbindungen begründet liegen. Zum anderen spielen intramolekulare Wechselwirkungen im Molekül sowie der Möglichkeit einer relativ stabilen Wechselwirkung

mit Lösungsmittel eine nicht unerhebliche Rolle. Potentiell verfügbare Bindungskapazitäten sind somit nicht mehr für Analytmoleküle zugänglich.

Interessante und reproduzierbare Ergebnisse konnten mit den Calix[6]aren-Verbindungen C6DA und deC6DA in Acetonitril gefunden werden. In Gegenwart von Atropin, einem Tropanalkaloid und Arginin, einer α -Aminosäure wurden spektrale Veränderungen hinsichtlich der Bandenlage sowie wesentliche Intensitätserhöhungen in gleicher Weise beobachtet. Bezüglich der Interaktion mit Atropin wurden detaillierte Untersuchungen durchgeführt. Es wird vermutet, dass mehrere Bindungspunkte basierend auf elektrostatischen Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindung und π - π -Stacking zu den wesentlichen Änderungen im Fluoreszenzverhalten führen. Vor dem Hintergrund des Einsatzes als Sondenmoleküle in Mikroarrays wurden Betrachtungen zur Selektivität und Querempfindlichkeit gegenüber ähnlichen Analytsubstanzen hinsichtlich Struktur und Eigenschaften durchgeführt. Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass eine selektive Erkennung von Atropin gegenüber ähnlich strukturierten Substanzen, wie Hyoscyamin oder Scopolamin nicht möglich ist. C6DA reagierte hinsichtlich der beobachteten Fluoreszenzänderungen ebenso auf Vertreter anderer Substanzklassen mit basischen Eigenschaften, wie Arginin, 4-tert-Butylbenzylamin und Ammoniumhydroxid als genannte Beispiele. Zum gegenwärtigen Stand der Erkenntnisse kann gesagt werden, dass C6DA und deC6DA auf bestimmte Substanzgruppen bzw. in basischer Umgebung unter genau definierten Bedingungen mit entsprechenden Änderungen im Fluoreszenzverhalten reagieren können, was für eine Anwendung in einem Mikroarray erfolgsversprechend ist.

Parallel zu den Untersuchungen in Lösung wurden in Hinblick auf die Entwicklung eines Mikroarrays ausgewählte Sondenmoleküle in Hydrogelfilme immobilisiert und deren fluoreszenzspektroskopisches Verhalten untersucht. Experimente zur Beladung der Hydrogelfilme mit Sondenmolekülen durch Diffusion oder kovalenter Anbindung über funktionelle Schnittstellen wurden durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass durch Diffusion mit Sondenmolekülen beladene Hydrogelfilme potentiell für Anwendung mit gasförmigen Analyten jedoch aufgrund der Auswascheffekte für flüssige Analytsubstanzen nicht geeignet erscheinen. Durch die kovalente Anbindung der Wirtverbindungen konnten Verbesserungen erzielt werden, die die Möglichkeit zur Anwendung sowohl für gasförmige als auch für flüssige Analyte in Mikroarrays geschaffen haben. Neben einer fluoreszenzspektroskopischen Charakterisierung der potentiellen Sondenmoleküle in der Hydrogelmatrix konnte gezeigt werden, dass die Änderungen im Fluoreszenzverhalten von C6DA mit Atropin übertragbar sind.

Aufbauend auf den gewonnenen Ergebnissen bestand im Weiteren das Ziel für ein funktionsfähiges Sensorsystem ein Verfahren zur Kalibrierung der an den eingesetzten Sondenmolekülen angelagerten Analyten zu konzipieren. Hierzu wurde der Einsatz einer kombinatorischen Methode von optischer Detektion und GC/MS angestrebt. Untersuchungen zur Thermostabilität sowie dem Anlagerungsverhalten von Terpene an die Hydrogelfilme wurden im Rahmen der Arbeit mittels HS-SPME GC/MS durchgeführt. Weiterhin wurde eine eigene Thermodesorptionseinheit für die angestrebten Chiparrays konzipiert. Die Desorption der an die Hydrogelmatrix angelagerten Analytsubstanzen in den Gaschromatographen erfolgt dabei mittels thermischer Energie. Ein erster

Funktionsbau steht zur Verfügung. Ziel ist es neben der Analyse der prototypischen Komponenten pro Sondenmolekül, durch Zuführung thermischer Energie eine teilweise oder sogar vollständige Regeneration der Sensorkomponenten in den Hydrogelfilmen zu erreichen. Auf diese Weise könnte ein mehrfach einsetzbares Sensorsystem geschaffen werden.

Durch die hier dargelegten Arbeiten sind wesentliche Kenntnisse zur Wechselwirkungsschnittstelle erhalten worden. Bis zur Realisierung eines funktionsfähigen Sensorsystems erfordert es aber weitere Schritte.

Die begonnenen Arbeiten zur Findung von Wirtmolekülen müssen weitergeführt werden. Das bedeutet in erster Linie die Kreation von neuen Molekülstrukturen, um die interessanten Gastsubstanzen ausreichend erfassen zu können. Interessant erscheinen dabei besonders Pinzettenmoleküle, dendritische Strukturen, Cyclodextrine und Calixarene. Diese, durch ihre Molekülstruktur, flexiblen potentiellen Wirte lassen einige wichtige Erkenntnisse und Ergebnisse erwarten.

Die prinzipiell nachgewiesene Möglichkeit der Immobilisierung der Wirtverbindungen auf der Chipoberfläche zeigt ein noch wesentliches zukünftiges Entwicklungsfeld. Die Einstellung von stabilen Bedingungen, zugeschnitten auf die Wirte, verbesserte Immobilisierungsstrategien sowie die Minimierung der eigenen Absorption sind dabei die Hauptpunkte.

In dieser Arbeit nicht beschrieben sind erste Untersuchungen mit immobilisierten Wirtmolekülen und Gastsubstanzen in der Gasphase. Das dort sich darstellende Verhalten zeigt voraussichtlich stabilere Ergebnisse als in der Anwendung in Flüssigsystemen. Dieser Punkt ist ebenfalls intensiv zu verfolgen, da wichtige Zielanwendungen auch im Gasphasenbereich liegen.

Neben den hier dargestellten Punkten sind die Arbeiten an dem technischen System, der optischen Auslese und der Auswertung von Daten voranzubringen. Da alle einzelnen Entwicklungsbereiche stark ineinander greifen, ist eine schrittweise Optimierung mit neuen Erfahrungen notwendig.

Literatur

- [1] P. Hauptmann, Sensoren, Carl Hanser Verlag, München, Wien, 1991
- [2] Suchmaschine Elsevier Science Direct, Mai 2006
- [3] J. Janata, M. Josowicz, Anal. Chem., 70, 179R-208R, (1998)
- [4] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, Pure & Appl. Chem., 63 (9), 1247-1250, (1991)
- [5] P. Gründler, Chemische Sensoren, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2004
- [6] D. E. Koshland, Jr., Angew. Chem., 106, 2468-2472, (1994)
- [7] H. J. Ache, Interdisciplinary Science Reviews, 18 (3), 280-288, (1993)
- [8] G. Sauerbrey, Z. Phys., 155, 206-222, (1959)
- [9] C. Behling, R. Lucklum, P. Hauptmann, Sensors and Actuators A, 68, 388-398, (1998)
- [10] M. Haug, K. D. Schierbaum, G. Gauglitz, W. Göpel, Sensors and Actuators B, 11 (1-3), 383-391, (1993)
- [11] F. L. Dickert, O. Schuster, Chemie in unserer Zeit, 28 (3), 147-152, (1994)
- [12] I. A. Koshets, Z. I. Kazantseva, Y. M. Shirshov, S. A. Cherenok, V. I. Kalchenko, Sensors and Actuators B, 106, 177-181, (2005)
- [13] C. Wang, X.-W. He, L.-X. Chen, Talanta, 57, 1181-1188, (2002)
- [14] C.-J. Lu, J.-S. Shih, Anal. Chim. Acta, 306, 129-137, (1995)
- [15] X.C. Zhou, S.C. Ng, H.S.O. Chan, S.F.Y. Li, Sens. & Act. B, 42, 137-144, (1997)
- [16] W. Schmidt, Optische Spektroskopie, VCH Verlagsgesellschaft, 1994
- [17] K. Cammann, Instrumentelle Analytische Chemie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, 2001
- [18] H. S. Nalwa, Handbook of Photochemistry and Photobiology, American scientific publishers, 2003
- [19] J. R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, 2 ed. New York, NY [u.a.], Kluwer Acad./Plenum Publ., 1999
- [20] P. Makedonski, M. Brandes, W. Grahn, W. Kowalsky, J. Wichern, S. Wiese, H.-H. Johannes, Dyes and Pigments, 61, 109-119, (2004)
- [21] O. S. Wolfbeis, B. P. H. Schaffar, Anal. Chim. Acta, 198, 1-12, (1987)
- [22] J. F. Gouin, F. Baros, D. Birot, J. C. André, Sens. Actuators B, 38-39, 401-406, (1997)
- [23] F.F. Bier, W. Stöcklein, M. Böcher, U. Bilitewski, R.D. Schmidt, Sens. & Act. B, 7, 509-512 (1997)
- [24] G. A. Bakken, G. W. Kauffman, P. C. Jurs, K. J. Albert, S. S. Stitzel, Sens. and Actuators B, 79, 1-10, (2001)
- [25] A. Schmautz, Sensors and Actuators B, 6 (1-3), 38-44, (1992)

- [26] Y.-S. Sohn, A. Goodey, E. V. Anslyn, J. T. McDevitt, J. B. Shear, D. P. Neikirk, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 303-312, (2005)
- [27] C. A. Marquette, A. Degiuli, L. J. Blum, *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 433-439, (2003)
- [28] D. James, S. M. Scott, Z. Ali, W. T. O'Hare, *Microchim. Acta*, 149, 1-17, (2005)
- [29] M. C. Pirrung, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41, 1276-1289, (2002)
- [30] W. Göpel, *Sensors and Actuators B*, 65, 70-72, (2000)
- [31] W. Neugebauer, *Dragoco Report*, 6, 257-263, 1998
- [32] T. Nakamoto, H. Takagi, S. Usami, *Sensors and Actuators B*, 8, 181-186, (1992)
- [33] J. White, J. S. Kauer, T. A. Dickinson, D. R. Walt, *Anal. Chem.*, 2191-2202, (1996)
- [34] D. S. B. Jr., D. Callahan, G. J. MacLay, J. R. Stetter, *Talanta*, 39 (12), 1657-1667, (1992)
- [35] K. Ema, M. Yokoyama, T. Nakamoto, T. Moriizumi, *Sensors and Actuators*, 18, 291-296, (1989)
- [36] H. V. Shurmer, J. W. Gardner, H. T. Chan, *Sensors and Actuators*, 18, 361-371, (1989)
- [37] H. Abe, S. Kanaya, Y. Takahashi, S. I. Sasaki, *Anal. Chem.*, 215, 155-168, (1988)
- [38] A. Prasanna de Silva, H. Q. Nimal Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.*, 97, 1515-1566, (1997)
- [39] J. Slavik, *Biochim. Biophys. Acta*, 694, 1, (1982)
- [40] E. R. Pantke, H. Labhart, *Chem. Phys. Lett.*, 16, 255, (1972)
- [41] R. Chen, *Anal. Biochem.*, 19, 374, (1967)
- [42] M. J. Kasha, *Discuss. Faraday Trans.*, 9, 14, (1950)
- [43] E. Vander-Dockt, C. Vogels, *Spectrochim. Acta*, 27 A, 2157, (1971)
- [44] V. Brückner, K.-H. Feller, U.-W. Grummt, *Applications of time-resolved optical spectroscopy*, Elsevier, Amsterdam, 1990
- [45] J.-M. Lehn, *Angew. Chem.*, 100, 91-116, (1988)
- [46] J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1995
- [47] C. J. Pedersen, *Angew. Chem.*, 100, 1053-1059, (1988)
- [48] D. J. Cram, *Angew. Chem.*, 100, 1041-1052, (1988)
- [49] M. W. P. L. Baars, E. W. Meijer, *Topics in Current Chemistry*, 210, 131-182, (2000)
- [50] A. Ueno, *Supramolecular Science*, 3, 31-36 (1996)
- [51] A. Pochini, R. Ungaro, eds. J. L. Atwood, J. E. D. Davies, MacNicol, F. Vögtle, Elsevier Science Ltd., Oxford, Vol. 2, 143, (1996)
- [52] F. Vögtle, *Supramolekulare Chemie*, B. G. Teubner Stuttgart, 1992
- [53] E. Weber, *Molecular Recognition in 'Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology'*, 4th ed., Suppl., Ed: J. I. Kroschwitz, Wiley, New York, 353-396, 1998

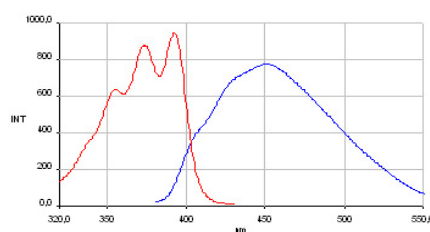
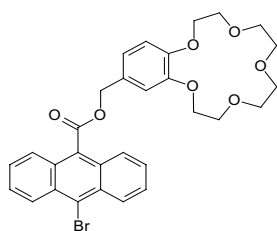
- [54] M. R. Truter, *Chem. Brit.*, 7, 203, (1971)
- [55] M. A. Bush, M. R. Truter, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 92, 1439, (1970)
- [56] F. Vögtle, E. Weber, *The Chemistry of the Ether Linkage*, Wiley, London, 1981
- [57] R. W. Saalfrank, N. Löw, S. Kareth, V. Seitz, F. Hampel, D. Stalke, M. Teichert, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37, 172-174, (1998)
- [58] P. R. Mallinson, M. R. Truter, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2, 1818, (1972)
- [59] F. Chekin, M. Bordbar, Y. Fathollahi, N. Alizadeh, *Spectrochimica Acta Part A*, 63, 370-376, (2006)
- [60] F. Vögtle, E. Weber, *Host Guest Complex Chemistry - Macrocycles - Synthesis, Structures, Applications*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1985
- [61] M. Hiraoka, *Crown Compounds, Their Characteristics and Applications*, Elsevier, 1982
- [62] J. J. Christensen, J. O. Hill, R. M. Izatt, *Science*, 174, 459, (1971)
- [63] G. J. Moody, J. D. R. Thomas, *Selective Ion Sensitive Electrodes*, Merrow Publishing Co., Watford, England, 1971
- [64] K. Cammann, *Das Arbeiten mit ionenselektiven Elektroden*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973
- [65] R. M. Izatt, J. J. Christensen, *Progress in Macrocyclic Chemistry*, 2, Wiley, New York, 1986
- [66] S. Penadés (Hrsg.), *Top. Curr. Chem.* 218 (2002), Springer, Berlin
- [67] F. Vögtle, *Pure Appl. Chem.*, 52, 2405 (1980)
- [68] T. Kaneda, K. Sugihara, H. Kamiya, S. Misumi, *Chem. Lett.*, 1781, (1982)
- [69] A. W. Czarnik, *Fluorescent Chemosensors for Ions and Molecular Recognition*, American Chemical Society: Washington D.C., 1993
- [70] H. Bouas-Laurent, A. Castellan, M. Daney, J.-P. Desvergne, G. Guinand, P. Marsaud, M.-H. Riffaud, *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 315, (1986)
- [71] H.-F. Ji, R. Dabestani, G. M. Brown, R.L. Hettich, *Photochem. Photobiol.*, 69, 513, (1999)
- [72] P. D. Beer, P. A. Gale, *Angew. Chem.*, 113, 502-532, (2001)
- [73] S. Harkema, G. J. van Hummel, K. Daasvatn, D. Reinhoudt, J. C. S. *Chem. Commun.*, 368-369, (1981)
- [74] F. Vögtle, W.M. Müller, W.H. Watson, *Topics in current chemistry* 125, 13, 164, Springer, 1984.
- [75] S. Patai (Hrsg.), *Crown ether and analogs*, John Wiley & Sons, Chichester, 1989
- [76] C. D. Gutsche, R. Muthukrishnan, *J. Org. Chem.*, 43, 4905-4906, (1978)
- [77] J. W. Cornforth, E. D. Morgan, K. T. Potts, R. J. Rees, *Tetrahedron*, 29, 1659-1667, (1973)

- [78] M. A. Molins, P. M. Nieto, C. Sanchez, P. Prados, J. de Mendoza, M. Pons, *J. Org. Chem.* 1992, 57, 6924 - 6931.
- [79] R. G. Janssen, J. P. M. van Duynhoven, W. Verboom, G. J. van Hummel, S. Harkema, D. N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 3666 - 3675.
- [80] W. P. van Hoorn, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt, *J. Org. Chem.* 1996, 61, 7180 - 7184.
- [81] J. Vicens, V. Böhmer, J. E. D. Davies, *Topics in Inclusion Science*, Dordrecht, 3, 1991
- [82] A. Casnati, P. Minari, A. Pochini, R. Ungaro, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1413-14, (1991)
- [83] C. D. Gutsche, *Calixarenes; Monographs in Supramolecular Chemistry*, ed. J. F. Stoddard, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, (1989)
- [84] T. J. Meade, D. H. Bush, *Prog. Inorg. Chem.*, 33, 59, (1985)
- [85] S. Shinkai, *Tetrahedron*, 49 (40), 8933-8968, (1993)
- [86] V. Böhmer, *Calixarene - Makrocyclen mit (fast) unbegrenzten Möglichkeiten*, *Angew. Chem.*, 107, 785-818, (1995)
- [87] L. Mandolini, R. Ungaro, *Calixarenes in Action*, Imperial College Press, 2000
- [88] Z. Asfari, V. Böhmer, J. M. Harrowfield, J. Vicens, (eds.), *Calixarenes 2001*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2001.
- [89] S. Shinkai, S. Mori, H. Koreishi, T. Tsubaki, O. Manabe, *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 2409 (1986)
- [90] I. Aoki, H. Kawabata, K. Nakshima, S. Shinkai, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1771 (1991)
- [91] I. Aoki, T. Sakaki, S. Tsutsui, S. Shinkai, *Tetrahedron Lett.*, 33, 89, (1992)
- [92] V. K. Gupta, R. Ludwig, S. Agarwal, *Anal. Chim. Acta*, 538, 213-218, (2005)
- [93] S. Shinkai, K. Araki, T. Matsuda, O. Manabe, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 62, 3856-3862 (1989)
- [94] R. Ludwig, Fresenius, *J. Anal. Chem.*, 367, 103-128, (2000)
- [95] J. Bügler, J. F. J. Engbersen, D. N. Reinhoudt, *J. Org. Chem.*, 63, 5339-5344, (1998)
- [96] S. Kunsági-Máté, G. Nagy, L. Kollár, *Anal. Chim. Acta*, 428, 301-307, (2001)
- [97] R. Ludwig, *Review, Microchim. Acta*, 152 (1-2), (2005)
- [98] R.M. Izatt, J.D. Lamb, R.T. Hawkins, P.R. Brown, S.R. Izatt, J.J. Christensen, *J. Am. Chem. Soc.*, 105, (1983), 1782
- [99] J.D. Glennon, E. Horne, D. Cocker, A. Kuhn, S.J. Harris, M. A. McKerver, *J. Chromatogr. A*, 731, 47-55 (1996)
- [100] J. Lörger, *Dissertation*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, 2004
- [101] K. Stanzl, J. Vollhardt, H. P. Nissen, *Dragoco Report*, 4, 165-169, (2000)

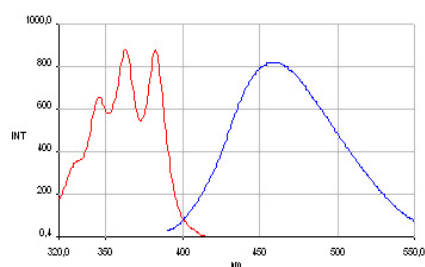
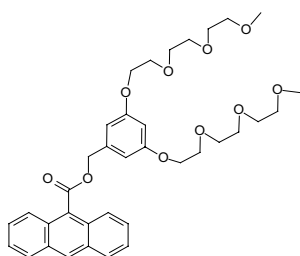
- [102] M. Hesse, Alkaloide -Fluch oder Segen der Natur?, Wiley-VCH - Weinheim, 2000
- [103] E. Breitmaier, Alkaloide, B. G. Teubner GmbH, Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden, 2002
- [104] M. Renil, M. Ferreras, J. M. Delaisse, N. T. Foged, M. Meldal, *J. Peptide Sci.*, 4, 195210, (1998)
- [105] M. Meldal, C. Laboratory, *Tetrahedron Letters*, 33 (21), 3077-3080, (1992)
- [106] nicht publizierte Ergebnisse des IPHT
- [107] J. Hagen, Technische Katalyse - Eine Einführung, VCH - Weinheim, 1996
- [108] A.J. Núñez, L.F. Gonzalez, J. Janák, *J. Chromatogr.*, 126, 757 (1976)
- [109] W.R. Betz, S.A. Hazard, E.M. Yearick, Firmenschrift, Supelco Inc. Supelco Park, Bellefonte (1990)
- [110] P. W. Atkins, Physikalische Chemie, VCH Verlagsgesellschaft, 1996
- [111] M.E. Miller, J.D. Stuart, *Anal. Chem.*, 71, (1), 23-27, (1999)
- [112] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction Theory and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997
- [113] J. Weber, Dissertation, Technische Universität Clausthal, 2003
- [114] P. J. Cragg, *A Practical Guide to Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, England, 2005
- [115] H. G. O. Becker, Einführung in die Photochemie, Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1975
- [116] D. Kunze, Diplomarbeit, Technische Universität Freiberg, 2004
- [117] K. Schönefeld, Diplomarbeit, Technische Universität Clausthal, 2004
- [118] N. Ghonheim, D. Scherrer, P. Suppan, *Journal of Luminescence*, 55, 271-275, (1993)
- [119] E. Lippert, W. Lüder, H. Boos, *Advances in Molecular Spectroscopy*, ed. A. Mangini, Pergamon Press, Oxford, 1962
- [120] R. J. Visser, C. A. G. O. Varma, *J. C. S. Faraday II*, 76, 453-471, (1980)
- [121] A. Weller, *Progress Reaction Kinetics*, 1, 189, (1961)
- [122] M. Waidelich, Dissertation, Würzburg 2005
- [123] H. Engelkamp, S. Middelbeek, R. J. M., Nolte, *Science*, 284 (5415), 785-788, (1999)
- [124] Hans Engelkamp, Roeland J. M. Nolte, *J. Porphyrins and Phthalocyanines*, 4, (5), 454-459, (2000)
- [125] A. Bär, Diplomarbeit, Fachhochschule Jena, 2005
- [126] J. Weber, Diplomarbeit, Fachhochschule Jena, 1997
- [127] W. J. Hurst, *Electronic Noses & sensor array based systems*, Technomic Publishing Company, 1999
- [128] M. Schimmelpfennig, Diplomarbeit, Fachhochschule Jena, 2006
- [129] K. Berka, K.-H. Feller, M. Kirschner, M. Schimmelpfennig, Patentschrift 10 2006 022 511.2 - 10.10.2005

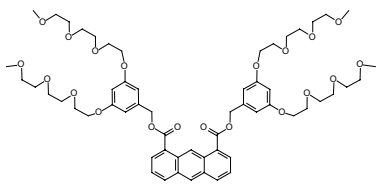
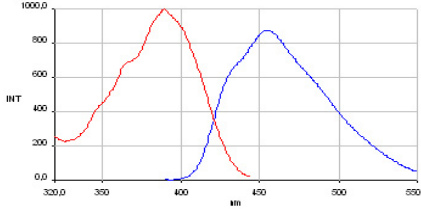
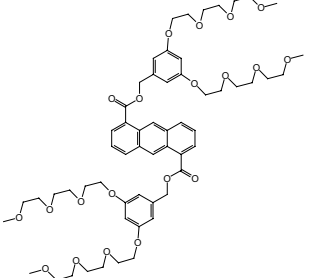
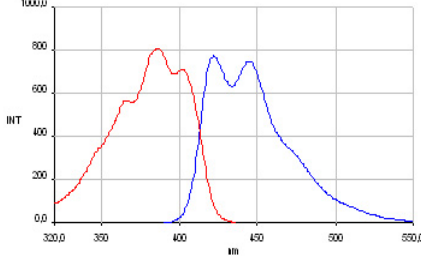
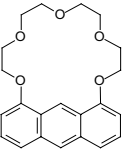
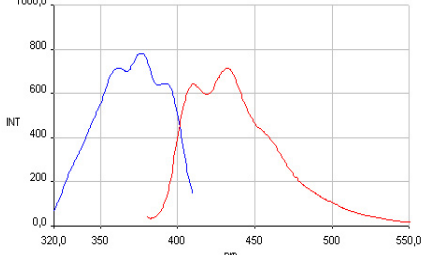
Anhang

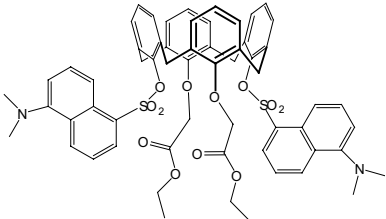
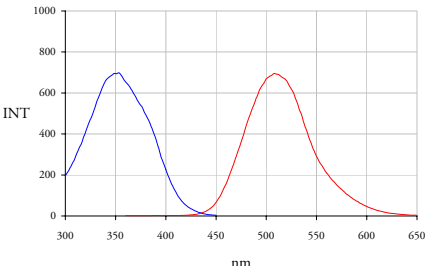
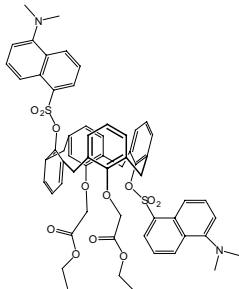
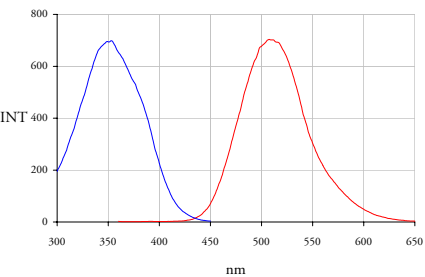
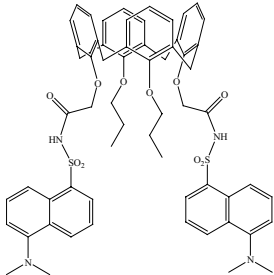
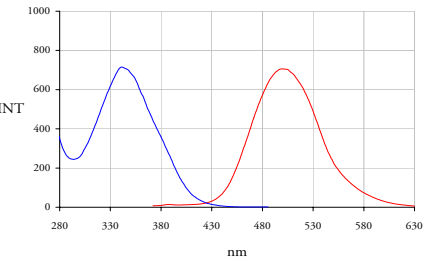
Abkürzung chemische Bezeichnung	Spektroskopische Eigenschaften
Struktur	Anregungsspektrum Emissionsspektrum
15K5A-Br 9-[(Benzo-15-krone-5)-4'-methylenoxycarbonyl]-10-bromanthracen	$\lambda_{Em} \text{ (max)} = 452 \text{ nm}$ $\lambda_{Ex} \text{ (max)} = 392 \text{ nm}$ Stokes shift 60 nm

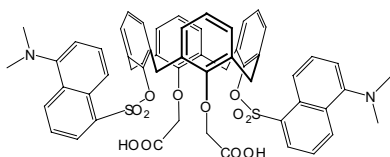
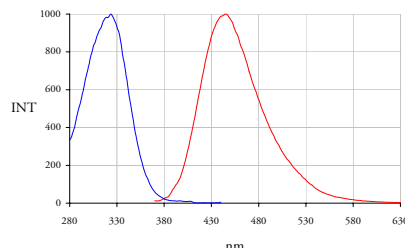
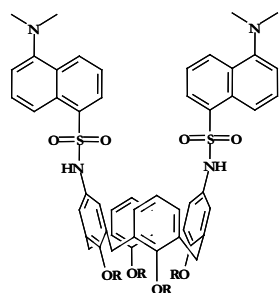
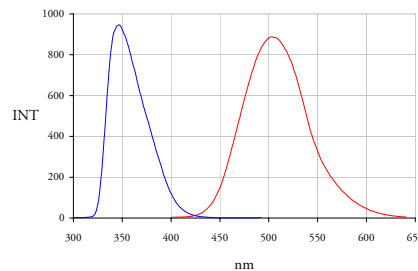
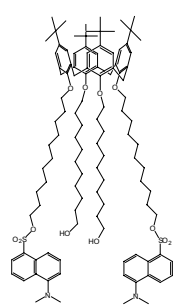
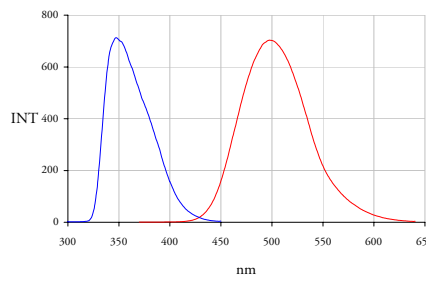


15K5A-O 9-[Bis-3,5-(3,6,9-trioxadecyloxy)phenyl-1-methylenoxycarbonyl]anthracen	$\lambda_{Em} \text{ (max)} = 460 \text{ nm}$ $\lambda_{Ex} \text{ (max)} = 362 \text{ nm}$ Stokes shift 98 nm
---	--

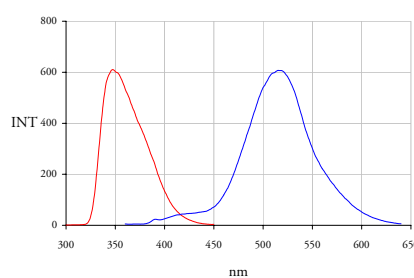
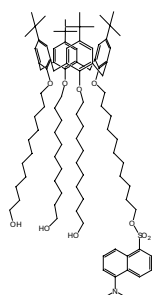


Abkürzung chemische Bezeichnung	Spektroskopische Eigenschaften
Struktur	Anregungsspektrum Emissionsspektrum
2-15K5A-O1 1,5-Di-[Bis-3,5-(3,6,9-trioxadecyl- oxy)phenyl-1-methylenoxycarbo- nyl]anthracen	$\lambda_{Em} \text{ (max)} = 455 \text{ nm}$ $\lambda_{Ex} \text{ (max)} = 390 \text{ nm}$ Stokes shift 65 nm
	
2-15K5A-O2 1,5-Di-[Bis-3,5-(3,6,9-trioxadecyl- oxy)phenyl-1-methylenoxycarbo- nyl]anthracen	$\lambda_{Em} \text{ (max)} = 421 \text{ nm}$ $\lambda_{Ex} \text{ (max)} = 385 \text{ nm}$ Stokes shift 36 nm
	
18K5A 1,8-Anthraceno-18-krone-5	$\lambda_{Em} \text{ (max)} = 431 \text{ nm}$ $\lambda_{Ex} \text{ (max)} = 376 \text{ nm}$ Stokes shift 55 nm
	

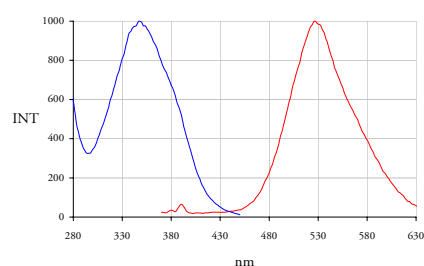
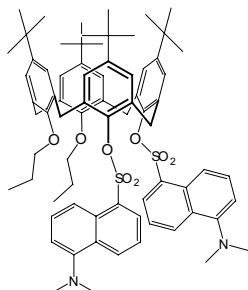
Abkürzung chemische Bezeichnung	Spektroskopische Eigenschaften
Struktur	Anregungsspektrum Emissionsspektrum
P45/1 25,27-Bis[(ethoxycarbonyl)methoxy]- 26,28-bis[5-(dimethylamino)naph- thyl-1-sulfonyloxy]-calix[4]aren ^{conc}	$\lambda_{Em} \text{ (max)} = 510 \text{ nm}$ $\lambda_{Ex} \text{ (max)} = 350 \text{ nm}$ (in Chloroform) Stokes shift 160 nm
	
P45/2 25,27-Bis[(ethoxycarbonyl)methoxy]- 26,28-bis[5(dimethylamino)naph- thyl-1-sulfonyloxy]-calix[4]aren ^{paco}	$\lambda_{Em} \text{ (max)} = 510 \text{ nm}$ $\lambda_{Ex} \text{ (max)} = 350 \text{ nm}$ Stokes shift 160 nm
	
P1 25,27-Dipropoxy-26,28-bis[(5- (Dimethylamino)naphthalen-1-sulfo- nyl)carbamoyl-methoxy]-calix[4]aren	$\lambda_{Em} \text{ (max)} = 500 \text{ nm}$ $\lambda_{Ex} \text{ (max)} = 340 \text{ nm}$ Stokes shift 160 nm
	

Abkürzung chemische Bezeichnung	Spektroskopische Eigenschaften
Struktur	Anregungsspektrum Emissionsspektrum
P64	λ_{Ex} (max) = 320 nm λ_{Em} (max) = 440 nm Stokes shift 120 nm
	
Calix40 5,17-Bis(5'-dimethylaminonaphthyl-1'-sulfonamido)-25,26,27,28-tetra- kis[(ethoxy-carbonyl)methoxy]- calix[4]aren (3)	λ_{Em} (max) = 346nm λ_{Ex} (max) = 495nm (in Chloroform) Stokes shift 149nm
	
P63/16	λ_{Em} (max) = 500 nm λ_{Ex} (max) = 348 nm Stokes shift 152 nm
	

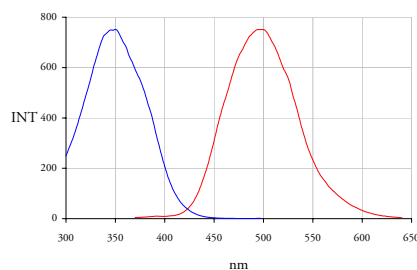
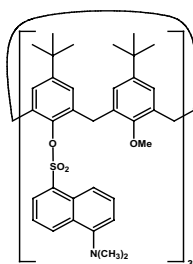
Abkürzung chemische Bezeichnung	Spektroskopische Eigenschaften
Struktur	Anregungsspektrum Emissionsspektrum
P63/17	$\lambda_{Em} \text{ (max)} = 516 \text{ nm}$ $\lambda_{Ex} \text{ (max)} = 348 \text{ nm}$ Stokes shift 168 nm



PSt2	$\lambda_{Em} \text{ (max)} = 527 \text{ nm}$ $\lambda_{Ex} \text{ (max)} = 349 \text{ nm}$ Stokes shift 178 nm
5,11,17,23-Tetra-tert-butyl-27,28-propoxy-25,26-bis[5-(dimethylamino)naphthyl-1-sulfonyloxy]-calix[4]aren	



MF1	$\lambda_{Em} \text{ (max)} = 495 \text{ nm}$ $\lambda_{Ex} \text{ (max)} = 350 \text{ nm}$ (in Chloroform) Stokes shift 145 nm
5,11,17,23,29,35-Hexa-tert-butyl-38,40,42-tris[(5-dimethylamino)naphthalen-1-sulfonyl]-oxy-37,39,41-trimethoxy-calix[6]aren	



Abkürzung chemische Bezeichnung	Spektroskopische Eigenschaften
Struktur	Anregungsspektrum Emissionsspektrum
MF2 Gemisch aus unterschiedlich substitu- ierten Calix[6]arenen	$\lambda_{Em} \text{ (max)} = 513 \text{ nm}$ $\lambda_{Ex} \text{ (max)} = 350 \text{ nm}$ (in Chloroform) Stokes shift 163 nm

